

ROBERTO JULIATTO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS  
COMBINADOS COM NITRITO DE SÓDIO E LACTATO DE SÓDIO NA  
GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Clostridium sporogenes* EM MORTADELA,  
COMO MODELO DE PESQUISA PARA O PROTEOLÍTICO *Clostridium botulinum*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Nina Waszczynskyj

CURITIBA

2015

---

J94a

Juliatto, Roberto

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias combinados com nitrito de sódio e lactato de sódio na germinação de esporos de *Clostridium sporogenes* em mortadela, como modelo de pesquisa para o proteolítico *Clostridium botulinum*/ Roberto Juliatto. – Curitiba, 2015.  
131 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,  
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2015.

Orientador: Nina Waszczynskyj .  
Bibliografia: p. 95-110.

1. Botulismo. 2. Carne - Bacteriologia. 3. Óleos essenciais. 4. Especiarias.  
I. Universidade Federal do Paraná. II. Waszczynskyj, Nina. III. Título.

CDD: 614.5125

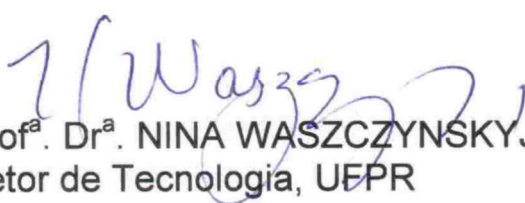
---

**ROBERTO JULIATTO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS COMBINADOS COM NITRITO DE SÓDIO E LACTATO DE SÓDIO NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Clostridium sporogenes* EM MORTADELA, COMO MODELO DE PESQUISA PARA O PROTEOLÍTICO *Clostridium botulinum*.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora:

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. NINA WASZCZYNSKYJ  
Setor de Tecnologia, UFPR

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. RENATA ERNLUND FREITAS DE MACEDO  
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, PUC/PR

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MICHELE RIGON SPIER  
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 09 de abril de 2015.

## DEDICATÓRIAS

*Dedico este trabalho a minha esposa Mari, e a meus filhos Carlos e Caroline, pela compreensão nos momentos que estive ausente.*

*Aos meus pais Ulisses e Odete (*in memoriam*), por toda a educação e os ensinamentos que me passaram, aos quais sou eternamente grato.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me iluminado, dado força e saúde neste período.

A minha orientadora Profa. Dra. Nina Waszczynskyj, pela sua confiança em meu trabalho, seu apoio, e sua paciência nos momentos difíceis, e principalmente pela sua amizade. Agradeço também por todas as críticas, sugestões, e os ensinamentos que me foram passados contribuindo para meu crescimento profissional.

A banca examinadora de qualificação Profa. Dra. Michele Rigon Spier e Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas Macedo pelas suas sugestões e correções que facilitaram e muito valorizaram este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realização deste grande objetivo em minha vida.

À empresa Frigorífico Juliatto, nas pessoas de seus diretores Ademir, Odenir, e Osires, pela compreensão e apoio na disponibilização do uso das instalações, matérias-primas, insumos e equipamentos que tornaram viáveis o processamento das formulações de mortadela.

À empresa Fego Alimentos, na pessoa de Jorge Onório, por ter fornecido os extratos e óleos essenciais.

À empresa Bremil, na pessoa de Nerci Klein, por ter fornecido os óleos essenciais.

À Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), na pessoa do Sr.º Ivano Filippis, pelo fornecimento das cepas microbiológicas.

José Adriano Barão e Emília Plochacz, funcionários do Frigorífico Juliatto pelo apoio durante as etapas de experimentais de processamento.

Ao Setor de Controle de Qualidade do Frigorífico Juliatto, nas pessoas de Alice, Gesiane e Indiara, por ter cedido parte do laboratório de microbiologia para realização da parte experimental.

Ao prof. José Alberto Silva pelo auxílio na análise estatística de dados, pelas explicações, e pela paciência.

A todos os colegas de pós-graduação da UFPR, pela ajuda sempre que necessária e pelo companheirismo.

A todo corpo docente do PPGEAL, que por meio do entusiasmo de suas aulas, contribuíram em minha formação e crescimento profissional nestes últimos dois anos.

Ao Paulo Roberto Krainski, secretário do PPGEAL, por todo o apoio durante o curso.

Ao Marcelo, técnico do laboratório de físico-química por todo apoio prestado na execução destas análises.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

## RESUMO

O efeito sinérgico de nitrito de sódio com lactato de sódio, combinados com extrato de orégano, óleos essenciais de coentro, cravo, alecrim, e noz-moscada, utilizados separadamente, foram testados em mortadela para controle da germinação de esporos de *Clostridium sporogenes* ATCC® 11437. Foi realizado um experimento fatorial 2x2x6, onde a primeira variável foi nitrito de sódio com duas concentrações 60µg/g e 120µg/g. A segunda variável foi lactato de sódio com dois níveis, um sem adição e outro com a adição de 1,2% p/v. A terceira variável estudada foi conservante naturais com 6 níveis onde os níveis utilizados foram de 0,2% p/p de extrato de orégano, 0,2% p/v de óleos essenciais de coentro, alecrim e noz-moscada, e 0,17% p/v de óleo essencial de cravo. Foram inoculados na mortadela entre 1200 a 3000 esporos/g de *C. sporogenes*, sendo então as mortadelas embaladas individualmente a vácuo e em seguida cozidas até a temperatura no ponto central atingir 78°C. Cinco amostras de cada formulação foram armazenadas em temperatura de 28°C ±1°C durante 60 dias ou até ocorrer a germinação dos esporos, que foi visualizada pelo estufamento das embalagens e confirmada pela presença de células vegetativas. O produto após o cozimento apresentou um pH variando entre 6,53 a 6,70, e atividade de água entre 0,944 a 0,957. A utilização da concentração de 1,2% de lactato de sódio nas formulações de mortadela apresentou um atraso na germinação dos esporos. Para as formulações com 60µg/g de nitrito de sódio sem lactato de sódio o tempo médio para a germinação dos esporos foi de 6 dias, e com adição de lactato o tempo aumentou para 21 dias. Nas formulações com adição de 120µg/g de nitrito sem lactato de sódio o tempo médio foi de 26 dias, e com adição de 1,2% de lactato de sódio aumentou para 37 dias. Fazendo-se análise estatística, utilizando um modelo linear generalizado com a resposta modelada por uma distribuição de Poisson, tendo como resposta o tempo para germinação dos esporos de *C. sporogenes*, obteve-se sinergismo entre o nitrito de sódio com óleo essencial de cravo (0,17%), onde o atraso na germinação dos esporos passou de 17 dias para 34 dias (valores médios) com adição de OE de cravo. Ocorreu também sinergismo entre lactato de sódio (1,2%) com o óleo essencial de coentro (0,20%), onde o atraso na germinação dos esporos passou de 32 dias para 52 dias (valores médios) com adição de OE de coentro. Ocorreu sinergismo entre nitrito de sódio, lactato de sódio e OE de alecrim (0,20%), onde o atraso na germinação dos esporos passou de 17 dias para 25 dias (valores médios) com adição de 60µg/g de nitrito e OE de alecrim, e de 32 dias para 45 dias (valores médios) com adição de 120µg/g de nitrito e OE de alecrim. Os resultados obtidos indicam que a utilização de 1,2% de lactato de sódio influenciou negativamente na germinação dos esporos, mostrando uma boa eficiência do lactato de sódio contra microorganismos do gênero *Clostridium*, e também indicou sinergismo entre o mesmo com nitrito de sódio e OE de coentro e alecrim.

Palavras-chave: Botulismo. Atividade antibotulínica. *Clostridium botulinum*. Botulismo em produtos cárneos.

## ABSTRACT

The synergistic effect of sodium nitrite with sodium lactate, combined with oregano extract, essential oils of coriander, cloves, rosemary, and nutmeg, used separately, were tested in mortadella for controlling the germination of *Clostridium sporogenes* ATCC® 11437 spores. A 2x2x6 factorial experiment was conducted, where first variable was sodium nitrite in two concentrations: 60µg/g and 120µg/g. Second variable was sodium lactate in two levels, one without and one with the addition of 1.2% w/v. The third studied variable was natural preservative in six levels, from which levels with 0.2% w/w of oregano extract, 0.2% w/v of essential oils from coriander, nutmeg, rosemary, and 0.17% w/v of essential oil of cloves were used. Between 1200 and 3000 spores/g of *C. sporogenes* were inoculated in mortadella, after which the mortadella were individually vacuum packed and cooked until temperature reached 78°C at the center point. Five samples of each formulation were stored at 28°C ± 1°C of temperature for 60 days or until the germination of spores, which was visualized by the stuffing of the packaging and confirmed by the presence of vegetative cells. The product, after cooking, had pH ranging between 6.53 and 6.70, and water activity between 0.944 and 0.957. The use of sodium lactate at 1.2% of concentration in the mortadella formulations showed a delay in the germination of spores. For formulations with 60µg/g of sodium nitrite without sodium lactate the average time to the germination of spores was 6 days and with addition of lactate the time increased to 21 days. In formulations with the addition of 120µg/g of nitrite without sodium lactate average time was 26 days and with addition of 1.2% sodium lactate it increased to 37 days. A statistical analysis using a generalized linear model with the response modeled by means of a Poisson distribution, receiving in return the time for germination of *C. sporogenes* spores was performed. Synergism between sodium nitrite with essential oil of clove (0.17%) was obtained, and the delay in the germination of spores went from 17 to 34 days (average values) with the addition of essential oil of clove. Synergism between sodium lactate (1.2%) with essential oil of coriander (0.20%) also occurred, in which the delay in the germination of spores went from 32 to 52 days (average values) with the addition of essential oil of coriander. Synergism has occurred between sodium nitrite, sodium lactate and essential oil of rosemary (0.20%), and the delay in the germination of spores increased from 17 to 25 days (average values) with 60µg/g of nitrite and essential oil of rosemary added, and from 32 to 45 days (average values) with the addition of 120µg/g of nitrite and essential oil of rosemary. The results indicate that the utilization of 1.2% of sodium lactate influenced negatively on the germination of spores, showing a good effectiveness of sodium lactate against microorganisms of the *Clostridium* genus, and indicate synergism between it and sodium nitrite and essential oils of coriander and rosemary.

Keywords: Botulism. Anti-botulinum activity. *Clostridium botulinum*. Botulism in meat products.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	NÚMERO DE CASOS SUSPEITOS E CONFIRMADOS DE BOTULISMO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1999 A 2011.....	23
FIGURA 2 -	NÚMERO DE ÓBITOS DE BOTULISMO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1999 A 2013.....	23
FIGURA 3 -	NÚMERO DE ÓBITOS DE BOTULISMO NOS EUA ENTRE OS ANOS DE 2001 A 2012.....	24
FIGURA 4 -	REAÇÃO DE CURA DA CARNE (FORMAÇÃO DA COR ROSADA) .....	28
FIGURA 5 -	ROTA DE UM ÁCIDO ORGÂNICO EM UM EXOPLASMA DE BAIXO pH EM PRESENÇA DE UMA CÉLULA MICROBIANA.....	36
FIGURA 6 -	ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS COMPONENTES DE ÓLEOS ESSENCIAIS .....	43
FIGURA 7 -	LOCAIS E MECANISMOS DE AÇÃO QUE PODEM SER SÍTIOS PARA AÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NA CÉLULA BACTERIANA.....	44
FIGURA 8 -	FLUXOGRAMA BÁSICO DE PRODUÇÃO DE MORTADELA.....	60
FIGURA 9 -	INFLUÊNCIA DO LACTATO DE SÓDIO NO pH DAS FORMULAÇÕES DE MORTADELA TESTADAS.....	77
FIGURA 10 -	INFLUÊNCIA DO LACTATO DE SÓDIO NA <i>aw</i> DAS FORMULAÇÕES DE MORTADELA TESTADAS.....	79
FIGURA 11 -	INFLUÊNCIA DOS CONSERVANTES NATURAIS NA <i>aw</i> DAS FORMULAÇÕES DE MORTADELA TESTADAS.....	79
FIGURA 12 -	INFLUÊNCIA DAS COMBINAÇÕES DE NITRITO DE SÓDIO, LACTATO DE SÓDIO, E CONSERVANTES NATURAIS, NO TEMPO (EM DIAS) PARA OCORRER A GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>C. sporogenes</i> .....	89

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CASOS DE BOTULISMO ALIMENTAR POR TIPO DE ALIMENTO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1999 A 2011.....	24
TABELA 2 -	CASOS DE BOTULISMO ALIMENTAR POR ORIGEM DO ALIMENTO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1999 A 2011.....	24
TABELA 3 -	FATORES AMBIENTAIS MAIS RELEVANTES QUE CONTROLAM ISOLADAMENTE O CRESCIMENTO DE <i>Clostridium botulinum</i> A, B, E, e F, EM ALIMENTOS.....	25
TABELA 4 -	COMPARATIVO ENTRE CEPAS DO PROTEOLÍTICO <i>Clostridium botulinum</i> , E DO <i>Clostridium sporogenes</i> .....	26
TABELA 4 -	LIMITES DE USO DE NITRITO E NITRATO DE SÓDIO EM ALGUNS PAÍSES EM PRODUTOS CÁRNEOS.....	35
TABELA 5 -	PRINCIPAIS COMPONENTES DE OE's QUE POSSUEM PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS.....	42
TABELA 6 -	TEOR MÁXIMO DE CÁLCIO EM BASE SECA EM MORTADELAS.....	58
TABELA 7 -	FORMULAÇÃO DE CONTROLE DA MORTADELA TESTADA....	63
TABELA 8 -	VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS ESTUDADOS.....	64
TABELA 9 -	MATRIZ DOS EXPERIMENTOS COM VALORES CODIFICADOS E REAIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2x2x6.....	65
TABELA 10 -	PORCENTAGEM DE MATÉRIAS-PRIMAS E ADITIVOS UTILIZADOS EM CADA FORMULAÇÃO DE MORTADELA TESTADA.....	68
TABELA 11 -	RESULTADO DAS DETERMINAÇÕES DE pH E ATIVIDADE DE ÁGUA PARA CADA FORMULAÇÃO DE MORTADELA TESTADA, REALIZADAS LOGO APÓS O TÉRMINO DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO.....	75
TABELA 12 -	RESULTADO MÉDIO DE TODAS AS DETERMINAÇÕES DE pH E ATIVIDADE DE ÁGUA, PARA TODAS AS AMOSTRAS DE MORTADELA TESTADAS.....	76

TABELA 13 -	RESUMO DO RESULTADO DA ANOVA APLICADA AOS DADOS DE pH OBTIDOS NAS FORMULAÇÕES DE MORTADELA TESTADAS.....	76
TABELA 14 -	RESUMO DO RESULTADO DA ANOVA APLICADA AOS DADOS DE <i>a<sub>w</sub></i> OBTIDOS NAS FORMULAÇÕES DE MORTADELA TESTADAS.....	78
TABELA 15 -	RESULTADO DO NITRITO RESIDUAL NAS MORTADELAS AO LONGO DOS 60 DIAS DE ESTOCAGEM A 28°C.....	81
TABELA 16 -	NÚMERO DE AMOSTRAS DE MORTADELA COM GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. sporogenes</i> POR NÚMERO DE AMOSTRAS INOCULADAS COM ESPOROS, PARA CADA EXPERIMENTO DURANTE O TEMPO DE ESTOCAGEM.....	83
TABELA 17 -	MÉDIAS ARITMÉTICAS DO TEMPO (EM DIAS) PARA OCORRER A GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>C. sporogenes</i> EM CADA FORMULAÇÃO DE MORTADELA TESTADA.....	88
TABELA 18	RESULTADO DO TESTE DE SIGNIFICÂNCIA DAS INTERAÇÕES DE SEGUNDA E TERCEIRA ORDEM DO MODELO, UTILIZANDO O TESTE DE QUI-QUADRADO DE WALD.....	88
TABELA 19	RESULTADO DAS INTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS DOS MODELOS DE SEGUNDA E TERCEIRA ORDEM, ONDE FORAM COMBINADOS NITRITO DE SÓDIO, LACTATO DE SÓDIO, E OS CONSERVANTES NATURA.....	90

## LISTA DE SIGLAS

$\Delta\psi$	- Potencial de membrana
ABIA	- Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos
ANOVA	- Analysis of variance (análise de variância)
ANVISA	- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	- American Type Culture Collection
ATP	- Adenosina Trifosfato
AUP	- Autorização de uso de produto
BHI	- Brian Heart Infusion
CIM	- Concentração inibitória mínima
CN	- Conservante natural
DIPOA	- Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DRCM	- Clostridial Diferencial Reforçado Base
EAFUS	- Everything Added to Food in the US
EFSA	- European Food Safety Authority
EU	- Europa
EUA	- Estados Unidos da América
EXOR	- Extrato de orégano
FAO	- Food and Agriculture and Organization
FDA	- Food and Drug Administration
FEMA	- Federal Emergency Management Agency
FIOCRUZ	- Fundação Osvaldo Cruz
FPM	- Força Próton Motriz
GAB	- Gabinete
GMC	- Grupo Mercado Comum
GRAS	- Alimento geralmente reconhecido como seguro
IDA	- Ingestão Diária Aceitável
IN	- Instrução Normativa
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
JECFA	- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

NaCl	- Cloreto de sódio
NaNO <sub>2</sub>	- Nitrito de sódio
NaNO <sub>3</sub>	- Nitrato de sódio
OE	- Óleo essencial
OE's	- Óleos essenciais
OEAL	- Óleo essencial de alecrim
OECO	- Óleo essencial de coentro
OECR	- Óleo essencial de cravo
OENM	- Óleo essencial de noz-moscada
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
SCN	- Sem conservantes naturais
SDA	- Secretaria de Defesa Agropecuária
SIPA	- Sistema de Inspeção de Produtos Animais
TPGY	- Trypticase Peptone Glucose Yeast
UFC	- Unidades Formadoras de Colônia
WHO	- World Health Organization

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg – microgramas  
A. – absorbância  
ac – antes de Cristo  
aw – atividade de água  
C. – *Clostridium*  
ctm – contagem total de mesófilas  
d. – divisão  
df – graus de liberdade  
e. – exatidão  
ed. – edição  
EXOR – extrato de orégano  
F. – fator de curva  
g/L – gramas por litro  
L. – *Listeria*  
LS – Lactato de sódio  
máx. – máximo  
mg – miligramas  
min – minuto  
mL – mililitro  
n. – número  
nm – nanômetro  
P. – massa  
p. – página  
p – probabilidade  
p/p – peso por peso  
p/v – peso por volume  
pH – potencial hidrogeniônico  
ppm – partes por milhão  
v. – volume  
v/p – volume por peso

## LISTA DE SÍMBOLOS

® - registrado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 ETIOLOGIA DO <i>Clostridium botulinum</i> .....	19
2.2 MODOS DE TRANSMISSÃO.....	20
2.2.1 Botulismos alimentar.....	21
2.2.2 Botulismo por fermentos.....	21
2.2.3 Botulismo intestinal.....	21
2.3 PATOGENIA DO <i>Clostridium botulinum</i> .....	21
2.4 PERÍODO DE INCUBAÇÃO.....	22
2.5 DADOS DO BOTULISMO NO BRASIL E EUA.....	22
2.6 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DOS ALIMENTOS PARA EVITAR O BOTULISMO.....	25
2.7 <i>Clostridium sporogenes</i> COMO MODELO DE PESQUISA PARA O PROTEOLÍTICO <i>Clostridium botulinum</i> .....	25
2.8 CONDIÇÕES PARA ESPORULAÇÃO DO <i>Clostridium sp</i> .....	27
2.9 NITRITO E NITRATO.....	27
2.9.1 Formação de nitrosaminas e aspectos toxicológicos.....	28
2.9.2 Função conservante do nitrito e nitrato.....	30
2.9.3 Aplicação e efeitos da utilização de nitrito em produtos cárneos.....	32
2.9.4 Alterações do nitrito e nitrato ao longo do tempo.....	33
2.9.5 Legislação sobre o uso de nitrito.....	34
2.10 LACTATO DE SÓDIO .....	35
2.10.1 Mecanismo de ação do lactato de sódio.....	36
2.10.2 Aspectos legais sobre o uso de lactato de sódio.....	37
2.10.3 Utilização de lactato de sódio em produtos cárneos.....	38
2.11 ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS.....	39
2.11.1 Métodos de extração de óleos essenciais.....	40
2.11.2 Componentes químicos presentes em OE's.....	41
2.11.3 Mecanismo de ação e atividade antimicrobiana de OE's.....	43
2.11.4 Efeito sinérgico e antagônico entre os componentes de OE's, e dos mesmos com conservantes alimentares e outros métodos de preservação.....	46



2.11.5 Carvacrol e Timol.....	49
2.11.6 Eugenol.....	50
2.11.7 p-cimeno.....	51
2.11.8 Carvone.....	51
2.11.9 Aldeído cinâmico.....	51
2.11.10 Aspectos legais para uso de OE's em alimentos.....	52
2.11.11 Aspectos organolépticos.....	52
2.11.12 Utilização de OE's em produtos cárneos.....	54
2.11.13 OE's no controle do <i>C. botulinum</i> .....	55
2.12 MORTADELA.....	56
2.12.1 Definição.....	56
2.12.2 Classificação.....	56
2.12.3 Composição.....	57
2.12.4 Requisitos sensoriais e físico-químicos.....	58
2.12.5 Padrões microbiológicos para mortadelas.....	59
2.12.6 Processos de fabricação de mortadelas.....	59
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
3.1 CULTURA MICROBIANA E PREPARO DO INÓCULO.....	61
3.2 PRODUÇÃO DA MORTADELA.....	62
3.2.1 Formulações utilizadas e delineamento experimental.....	63
3.2.2 Processos de fabricação da mortadela.....	66
3.2.3 Inoculação dos esporos.....	70
3.2.4 Cozimento do produto.....	70
3.2.5 Estocagem das mortadelas.....	71
3.2.6 Análises físico-químicas.....	71
3.2.7 Acompanhamento da germinação de esporos.....	72
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	73
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
4.1 RESULTADOS DO pH E ATIVIDADE DE ÁGUA.....	75
4.2 RESULTADO DO NITRITO RESIDUAL AO LONGO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO.....	80
4.3 RESULTADO DA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>C. sporogenes</i> NAS MORTADELAS DURANTE O PERÍODO DE INCUBAÇÃO.....	82

4.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS PARA O TEMPO PARA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>C. sporogenes</i> .....	88
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	94
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
<b>ANEXOS</b> .....	111

## 1 INTRODUÇÃO

O mercado de embutidos do Brasil vem crescendo significativamente nos últimos anos, uma vez que o consumo destes produtos tornou-se hábito de uma parcela considerável da população. Estes produtos aliam aspectos sensoriais agradáveis a um custo reduzido, quando comparados aos cortes de carne tradicionais *in natura*. A mortadela é um produto cárneo emulsionado embutido que proporcionou o acesso das classes sociais menos favorecidas a proteínas de origem animal, tornando-se possível a ingestão proteica mínima recomendada a estas classes sociais (OLIVEIRA, 2010).

Nos últimos anos ocorreram vários casos de botulismo alimentar no Brasil, sendo que vários destes estavam relacionados com o produto mortadela. Segundo o SINAN (BRASIL, 2014) entre os anos de 1999 a 2013 foram constatados 255 casos suspeitos de botulismo, dos quais 79 foram confirmados, e destes 15 estavam relacionados com o produto mortadela. O botulismo é uma doença de extrema gravidade que ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com toxinas pré-formadas pelo *Clostridium botulinum*. A ocorrência dos casos citados acima é extremamente grave tanto do ponto de vista médico, por ser esta toxina uma das mais potentes conhecidas, podendo levar a óbito rapidamente, como do ponto de vista sanitário dos alimentos envolvidos, pois indica que estes foram produzidos em desacordo com as normas sanitárias vigentes, ou que as mesmas possuem falhas ou deficiências que não são capazes de garantir a inocuidade destes alimentos produzidos com relação a esta bactéria.

O conservante utilizado, no Brasil, em produtos cárneos para evitar o botulismo é o nitrito de sódio ou de potássio. O uso deste conservante pode gerar substâncias carcinogênicas (nitrosaminas) em embutidos, e o seu uso vem sendo limitado nos últimos anos pelos órgãos fiscalizadores. O limite residual de nitrito em mortadela é regulamentado pela Instrução Normativa n.º 51/06 (BRASIL, 2007), e pelo Ofício Circular n.º 15/09 (BRASIL, 2009), que regulamentam o residual máximo de nitrito e nitrato em 150ppm expresso em nitrito de sódio.

Associado à redução dos níveis de conservantes temos ainda no Brasil a falta de estrutura dos estabelecimentos produtores, e dos que comercializam mortadela no varejo, em manter este produto em refrigeração adequada. Isto faz com que o produto

fique exposto por longos períodos a temperaturas inadequadas (acima de 25°C), antes de ser consumido. Além deste problema temos também mortadelas sendo produzidas com alta atividade de água (*aw*), principalmente mortadelas de carne de frango. Altas temperaturas de armazenamento, baixos teores de nitrito residual, e altos valores de *aw*, tornam o produto um meio propício para a germinação de esporos de *Clostridium botulinum* e a produção de sua toxina.

Devido à gravidade, e à letalidade da doença causada pelo *Clostridium botulinum*, e às condições favoráveis a sua multiplicação em mortadelas, devem ser estudadas novas alternativas para evitar a ocorrência desta doença. A utilização da “teoria dos obstáculos”, onde se utilizam aditivos naturais, um processamento alimentar brando, e quantidades menores de aditivos químicos, obtendo um produto final seguro com boas qualidades sensoriais, são atributos que devem ser buscados pela indústria de alimentos (LEISTNER, 1999).

Os consumidores estão buscando cada vez mais alimentos de boa qualidade, com vida útil longa, e o mais natural possível, ou seja, com a presença mínima de conservantes sintéticos, o que também vem sendo uma tendência da legislação mais recente de alimentos, a utilização de produtos naturais com propriedades antimicrobianas vem sendo bastante estudada. Neste contexto os óleos essenciais (OE's) de especiarias surgem como uma alternativa factível, não só na substituição, mas também em uso conjunto para redução da utilização de conservantes sintéticos em alimentos (OLIVEIRA, 2010).

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a eficácia do uso de nitrito de sódio e lactato de sódio em conjunto com outros antimicrobianos naturais para controlar o crescimento do *Clostridium sporogenes* em mortadela conservada em temperatura de +28°C. Avaliou-se o sinergismo entre o nitrito de sódio, juntamente com lactato de sódio e OE's de especiarias. Neste estudo foram utilizados extrato de orégano, OE's de coentro, cravo, noz-moscada e alecrim, os quais foram combinados individualmente com quantidades variáveis de nitrito de sódio e lactato de sódio.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ETIOLOGIA do *Clostridium botulinum*

*C. botulinum* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica, de forma bacilar, esporulada. É encontrada com frequência no solo, em legumes, verduras, frutas, sedimentos aquáticos e fezes humanas. É um habitante normal do trato intestinal de mamíferos, aves, e peixes, onde se multiplica e é excretado em grandes quantidades nas fezes por mais de oito semanas após a primeira infecção (EDUARDO et al., 2002; FREAN et al., 2004). Sua presença no solo é a responsável pela contaminação de vegetais, mamíferos, aves, e peixes (SMITH, 1980).

Os esporos de *C. botulinum* são as formas mais resistentes que existem entre os agentes bacterianos, sendo que esporos podem sobreviver por mais de 30 anos em meio líquido, e por mais tempo ainda em estado seco, ou desidratados (RADOSTITS et al., 2002). Os mesmos podem tolerar temperaturas de 100°C por horas, mas para destruir os esporos é preciso realizar o tratamento térmico a 121°C por 30 minutos (esterilização comercial) (KETCHAM e GOMES, 2003).

Existem sete tipos de *C. botulinum* que se distinguem pelas características das neurotoxinas por eles produzidas, classificadas de A a G, as quais produzem ação farmacológica similar. As mesmas também são sorologicamente distintas, altamente potentes, e acometem espécies animais também. As toxinas perdem sua atividade quando submetidas à temperatura de 80°C durante 30 minutos, ou 100°C por 5 minutos. Também quando expostas a luz solar por 1 a 3 horas (PINILLOS et al., 2003).

As toxinas que causam doenças em seres humanos são os do tipo A, B, C e raramente o F. Os do tipo C e D estão relacionados com animais. O tipo G também foi associado com alguns casos de morte súbita em humanos (DODDS E AUSTIN, 2001; CERESER et al., 2008).

As cepas de *C. botulinum* também são subdivididas em quatro grupos baseados em suas diferenças fisiológicas:

Grupo I: todas as cepas do tipo A, e as cepas proteolíticas do tipo B e F. A temperatura ótima de crescimento é 37°C, ocorrendo crescimento entre 10 a 48°C. Produzem altos níveis de neurotoxina. Os esporos possuem elevada termo resistência

com valores de  $D_{100}$  <sup>(1)</sup> de aproximadamente 25 minutos. Para inibir seu crescimento deve-se ter ambiente com pH abaixo de 4,6, concentração de sal superior a 10% e atividade de água abaixo de 0,94.

Grupo II: todas as cepas do tipo E, e as não proteolíticas dos tipos B e F. A temperatura ótima de crescimento é 30°C, mas crescem e produzem toxinas em temperaturas de 3,3°C. A termo resistência dos esporos é menor com valor  $D_{100}$  de menos de 0,1min. As cepas do grupo II são inibidas em pH inferior a 5,0, com concentrações de sal acima de 5%, e atividade de água abaixo de 0,97.

Grupo III: inclui as cepas dos tipos C e D, as quais são associadas somente ao botulismo animal. São anaeróbias, não proteolíticas, crescem em temperatura mínima de 15°C, e a temperatura ótima é de 40°C.

Grupo IV: inclui as cepas do tipo G, as quais crescem em temperatura ótima de 37°C, tendo temperatura mínima de crescimento de 10°C. Raramente se observam esporos, os quais possuem termo resistência relativamente baixa, com valores de  $D_{100}$  de 0,8 a 1,12 min.

As cepas do grupo I e II são as mais comumente encontradas em enfermidades humanas, causadas por alimentos contaminados (SMITH, 1980; DODDS E AUSTIN, 2001).

## 2.2 MODOS DE TRANSMISSÃO

Segundo o Manual Integrado de Vigilância Epidemiológica do Botulismo, o modo de transmissão da doença tem importância na apresentação clínica e nas ações de vigilância epidemiológica, e dividem-se em (BRASIL, 2006):

<sup>(1)</sup> Valor D é o tempo necessário para inativar 90% dos microorganismos na temperatura citada.

### 2.2.1 Botulismo alimentar

Ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com a neurotoxina. Isto ocorre devido à produção de alimentos de forma inadequada, ou armazenamento em condições impróprias. Ocorre principalmente pelo consumo de conservas de vegetais (palmito, picles), produtos cárneos (salsicha, mortadela, presuntos), peixes, queijos, mel, e raramente em enlatados (BRASIL, 2006).

### 2.2.2 Botulismo por ferimentos

Ocasionado pela contaminação de ferimentos com *C. botulinum* que em condições de anaerobiose, assume a forma vegetativa e produz toxinas *in vivo*. É uma das formas mais raras de botulismo (BRASIL, 2006).

### 2.2.3 Botulismo intestinal

Resulta da ingestão de esporos presentes no alimento, seguida da fixação e multiplicação do agente no trato intestinal, onde ocorre a produção e absorção de toxina. Ocorre com maior frequência em crianças de 3 a 26 semanas de vida, devido a ausência da microbiota intestinal competitiva de proteção (BRASIL, 2006).

## 2.3 PATOGENIA do *Clostridium botulinum*

Após a ingestão da toxina, ela é transportada via hematogênica até neurônios sensíveis. Estas neurotoxinas atuam nas junções neuromusculares bloqueando a liberação da acetilcolina, a qual é mediadora da ação dos nervos periféricos. Isto

causa a paralisia flácida evoluindo a óbito devido a paralisia dos músculos respiratórios (CDC, 2000; JOHNSON e BRADSHAW, 2001).

## 2.4 PERÍODO DE INCUBAÇÃO

O período de incubação depende se a toxina foi ingerida diretamente, ou se ocorreu ingestão dos esporos, ou se a contaminação foi por ferimentos. Períodos de incubação curtos sugerem maior gravidade e maior risco de letalidade.

**Botulismo alimentar:** pode variar de duas horas a dez dias, com média de 12 a 36 horas de incubação. Quanto maior a concentração de toxina no alimento, menor é o período de incubação.

**Botulismo por ferimento:** pode variar de quatro a 21 dias, com média de sete dias.

**Botulismo intestinal:** o período não é conhecido devido à impossibilidade de determinar o momento de ingestão dos esporos (BRASIL, 2006).

## 2.5 DADOS DO BOTULISMO NO BRASIL E EUA

Segundo dados publicados pelo Ministério da Saúde todos os anos temos casos confirmados de botulismo de origem alimentar no Brasil, sendo que alguns deles levam os enfermos a óbito como mostram as figuras 1 e 2. Dentre os casos confirmados verifica-se que 23% deles são oriundos de produtos derivados de suíno (tabelas 1 e 2). Na figura 3 estão relacionados os casos confirmados de botulismo de origem alimentar nos EUA de 2001 a 2012, segundo dados publicados pelo CDC (Centers For Disease Control and Prevention) (CDC, 2014).



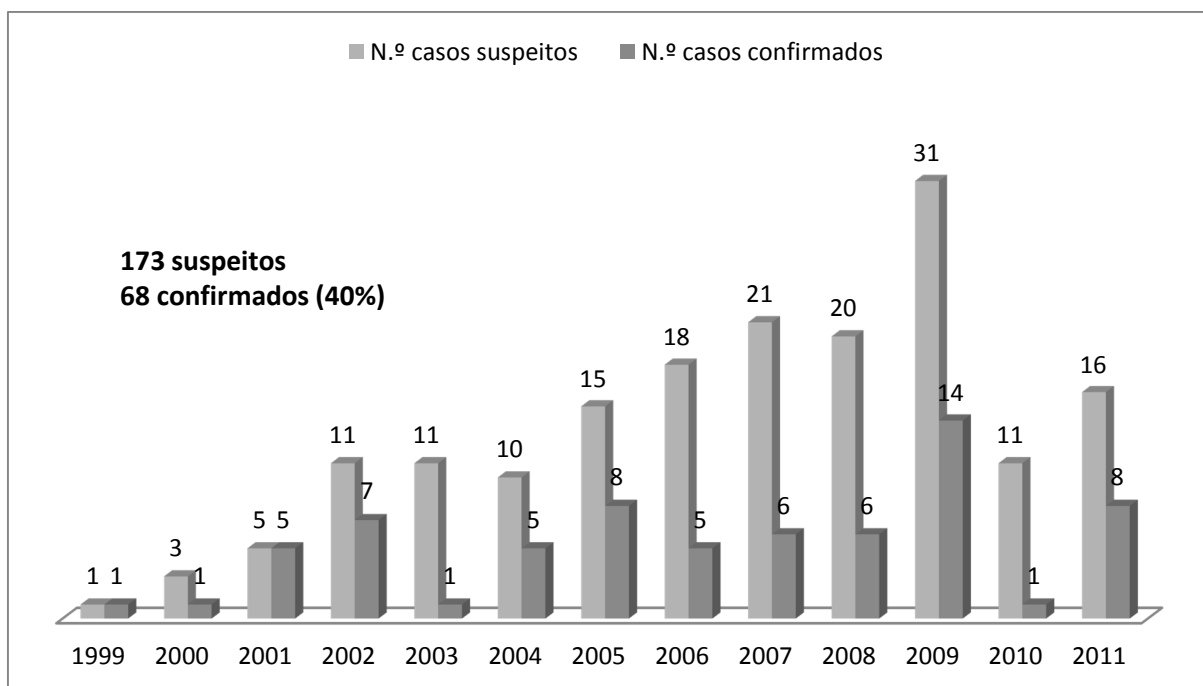


FIGURA 1 - NÚMERO DE CASOS SUSPEITOS E CONFIRMADOS DE BOTULISMO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1999 A 2011  
 FONTE: BRASIL (2011)

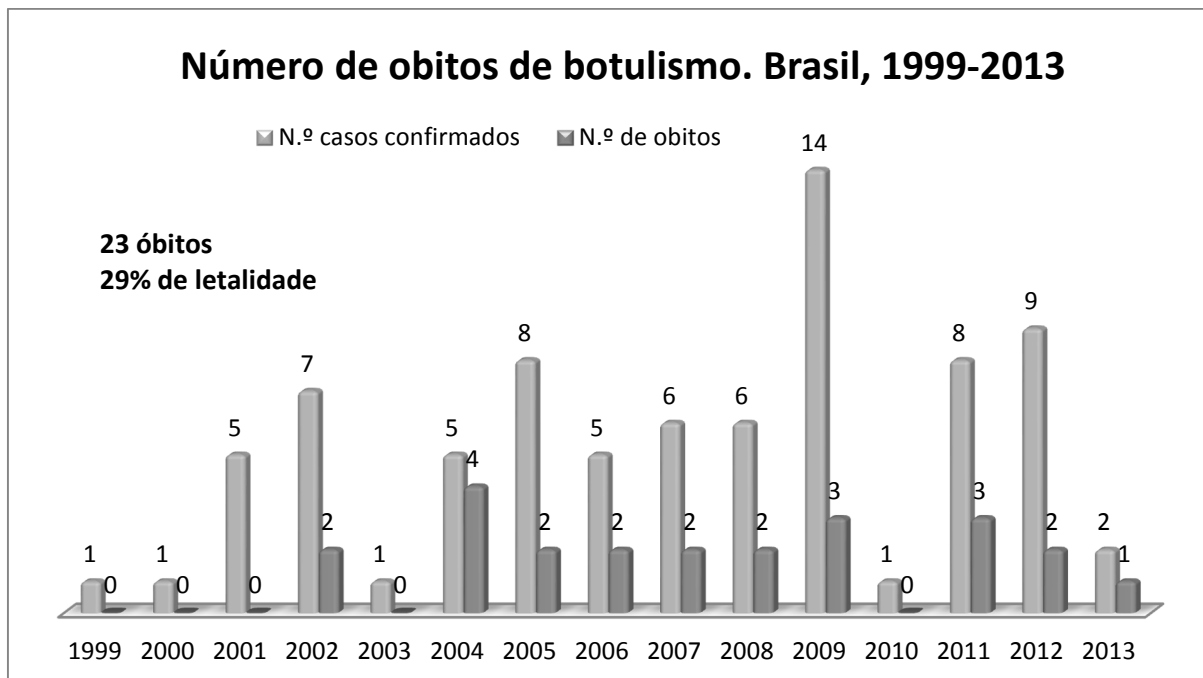


FIGURA 2 - NÚMERO DE ÓBITOS DE BOTULISMO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1999 A 2013  
 FONTE: BRASIL - SINAN (2014)

TABELA 1 - CASOS DE BOTULISMO ALIMENTAR POR TIPO DE ALIMENTO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1999 A 2011

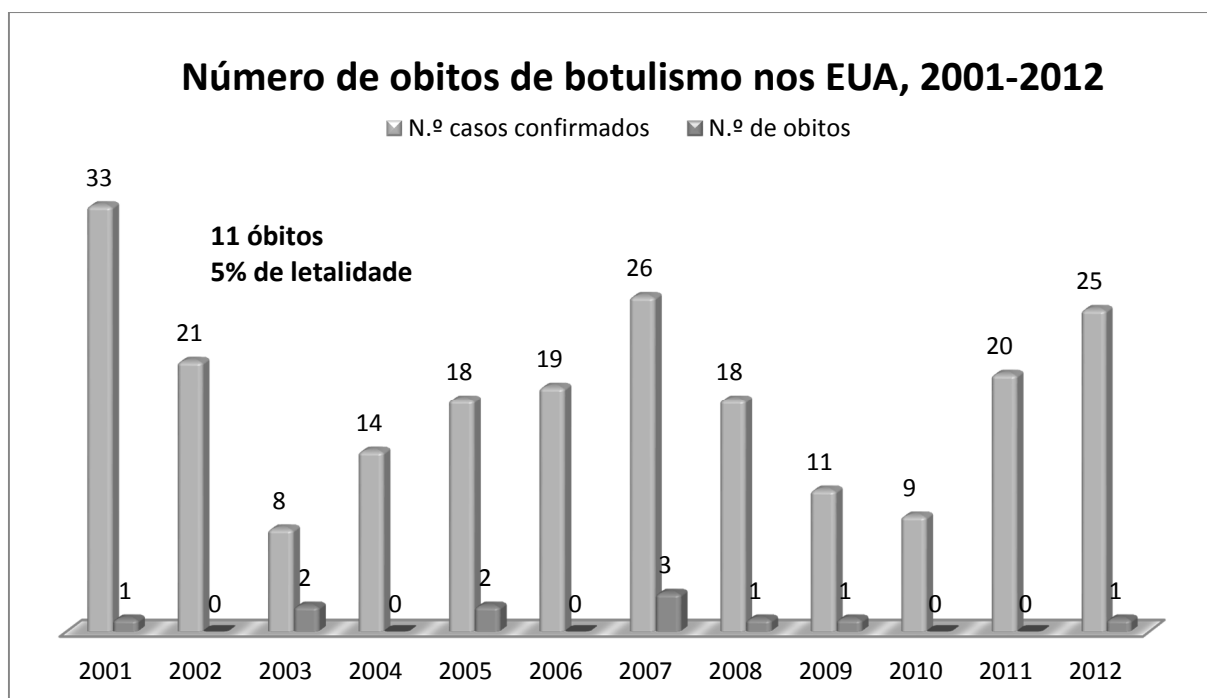
Alimento	N.º Casos	%
Produtos suínos	15	23
Sardinha enlatada/ mortadela	11	17
Palmito	6	9
Torta de frango	9	14
Tofu	4	6
Outros	5	7
Ignorado	16	24
Total	66	100

FONTE: BRASIL (2011)

TABELA 2 - CASOS DE BOTULISMO ALIMENTAR POR ORIGEM DO ALIMENTO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1999 A 2011

Origem	N.º Casos	%
Caseiro	21	31
Industrializado	26	40
Comercial	10	15
Ignorado	9	14
Total	66	100

FONTE: BRASIL (2011)

FIGURA 3 - NÚMERO DE ÓBITOS DE BOTULISMO NOS EUA ENTRE OS ANOS DE 2001 A 2012  
Fonte: EUA - CDC (2014)

## 2.6 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DOS ALIMENTOS PARA EVITAR O BOTULISMO

Vários fatores de natureza física e/ou química podem ser utilizados para evitar o desenvolvimento do *Clostridium botulinum* em alimentos. Podemos citar como principais e mais utilizados: controle da atividade de água, uso de altas ou baixas temperaturas, acidez, e uso de conservantes como cloreto de sódio, nitritos, e lactato de sódio (DODDS e AUSTIN, 2001; MASS, GLASS, DOYLE, 1989). Na tabela 3 podem ser observadas algumas destas barreiras.

TABELA 3 - FATORES MAIS RELEVANTES QUE CONTROLAM ISOLADAMENTE O CRESCIMENTO DO *Clostridium botulinum* A, B, E, F, EM ALIMENTOS

Fatores	Grupo I (cepas A, B e F)	Grupo II (cepas B, E e F)
Temperatura mínima de crescimento (°C)	10	3,3
Temperatura ótima de crescimento (°C)	35-40	18-25
Temperatura máxima de crescimento (°C)	~50	~45
pH mínimo de crescimento	4,60	5,0
Concentração de inibitória de NaCl	≥10%	≥5%
Atividade de água mínima de crescimento	0,94	0,97
Tratamento térmico dos esporos D100 °C	25min	0,1min

FONTE: DODDS E AUSTIN (2001)

Frequentemente o *C. botulinum* é inibido por diversos fatores, os quais podem apresentar interação entre eles. Em alguns casos podemos ter apenas um fator inibindo seu crescimento, como no caso de alimentos enlatados de baixa acidez (pH abaixo de 4,6) (AMSTALDEN, SERRANO, MANHANI, 1997).

## 2.7 *Clostridium sporogenes* COMO MODELO DE PESQUISA PARA O PROTEOLÍTICO *Clostridium botulinum*

*Clostridium sporogenes* são bacilos Gram-positivos, anaeróbios, esporulados, que diferem do *C. botulinum* apenas por não produzirem neurotoxinas. Os putrefativos

*Clostridium sporogenes* PA 3679 têm sido amplamente utilizados como um substituto para o proteolítico *Clostridium botulinum* na validação de processos térmicos para alimentos, sendo também utilizados como modelo de pesquisa para as estirpes proteolíticas de *C. botulinum* (BROWN, TRAN-DINH, CHAPMAN, 2012).

Brown, Tran-Dinh, Chapman (2012) citam que dentre as vantagens que existem na substituição do *C. botulinum* pelo *C. sporogenes* em processos térmicos ou modelos de pesquisa tem-se:

- Não produzir neurotoxinas;
- Fácil detecção através do odor ou formação de gás;
- Apresentar similaridade genética com cepas proteolíticas do *C. botulinum*;
- A relativa facilidade com que culturas de esporos com alta resistência térmica podem ser produzidas;
- Possuir resistência térmica um pouco acima da do *C. botulinum*, o que o caracteriza como um bom substituto para validar processos térmicos.

TABELA 4 - COMPARATIVO ENTRE CEPAS DO PROTEOLÍTICO *Clostridium botulinum*, E DO *Clostridium sporogenes*

Fatores	<i>C. botulinum</i>	<i>C. sporogenes</i>
Produção de neurotoxinas	sim	não
Temperatura ótima de crescimento (°C)	37	37
Produção de esporos	baixa	alta
pH mínimo de crescimento	4,60	4,60
Concentração de inibitória de NaCl	≥10%	≥10%
Atividade de água mínima de crescimento	0,94	0,94
Tratamento térmico dos esporos D121 °C	0,1-0,2min	1,2-2,5min

FONTE: SMITH (1980); BROWN, TRAN-DINH, CHAPMAN (2012)

Bradbury et al. (2012) analisaram a sequência genética do *C. sporogenes* PA 3679, e como resultado de sua análise preliminar concluíram que existe um elevado grau de parentesco entre essas cepas com as cepas sequenciadas de *C. botulinum*.

Cui, Gabriel, Nakano (2010) avaliaram a eficácia de vários extratos de plantas combinados com nitrito de sódio contra várias cepas de *C. botulinum* e também contra *C. sporogenes* PA 3679. Verificaram que não ocorreram grandes diferenças nos resultados, podendo então o *C. sporogenes* PA 3679 substituir adequadamente o *C. botulinum* em modelos de pesquisa.

## 2.8 CONDIÇÕES PARA ESPORULAÇÃO DO *Clostridium sp*

Segundo Smith (1980), para se obter um melhor resultado na produção de esporos de *Clostridium sp* alguns fatores devem ser observados, dentre eles temos:

- O meio não deve conter altas quantidades de sal (NaCl), pois elas inibem a formação de esporos;
- A temperatura de incubação deve manter-se entre 3 a 5°C abaixo da temperatura ótima de crescimento;
- A incubação deve ocorrer em condições de anaerobiose estrita;
- Não se deve utilizar períodos muito longos de esporulação, pois os esporos podem germinar. Melhores resultados são obtidos com 4 dias de incubação;
- Recomenda-se agitação contínua;
- O meio de cultura deve ter grande quantidade de aminoácido arginina (250 mg/L).

## 2.9 NITRITO E NITRATO

O uso de nitritos e nitratos na forma de sais de sódio ou potássio em produtos cárneos curados é realizado com objetivo de fornecer coloração rósea, sabor, aroma, agir como antioxidante de gorduras, e também para a conservação dos produtos, principalmente contra bactérias do gênero *Clostridium*. O teor de nitrito diminui com o aquecimento e durante o armazenamento dos produtos. Os nitratos adicionados aos produtos cárneos sofrem redução pela ação de várias bactérias as quais retiram um elétron formando o nitrito durante o processo de cura destes produtos. O íon nitrito é bastante reativo podendo comportar-se como agente redutor ou oxidante. Em meio ácido, ele se ioniza formando ácido nitroso ( $3\text{HNO}_2$ ), o qual se decompõe em óxido nítrico (NO), que reage com o pigmento mioglobina da carne formando nitrosomioglobina, responsável pela coloração rosada das carnes curadas (figura 4). O nitrito também pode ser reduzido pelo ascorbato ou eritorbato (quando adicionados em carnes curadas) formando o óxido nítrico (JAY, LOESSNER, GOLDEN, 2005).

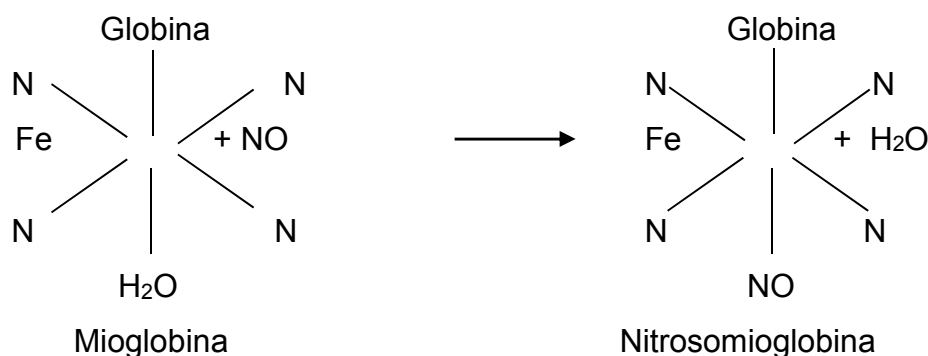


FIGURA 4 - REAÇÃO DE CURA DA CARNE (FORMAÇÃO DA COR ROSADA)  
 FONTE: JAY, LOESSNER, GOLDEN (2005)

A comunidade científica sugere que seja adicionada a quantidade mínima de 50 mg de  $\text{NaNO}_2/\text{kg}$  (50ppm) de carne, para que ocorra a estabilidade do pigmento nitrosilhemocromo responsável pela coloração rosada em produtos cárneos curados cozidos. Também sugere um mínimo de 40 mg de  $\text{NaNO}_2/\text{kg}$  (40ppm) de carne, para o desenvolvimento do sabor e aroma característicos dos produtos cárneos curados cozidos (STEGEMAN e VERKLEIJ, 2008).

### 2.9.1 Formação de nitrosaminas e aspectos toxicológicos

A utilização de nitritos e nitratos em produtos cárneos tem sido vista com preocupação pela comunidade científica mundial, devido à possível formação de nitrosaminas, as quais possuem ação carcinogênica. Esta descoberta aconteceu na década de 70, e desde então muitos estudos têm sido realizados neste âmbito. O uso indiscriminado do nitrito e nitrato passou a ser mais controlado, sendo seguidamente reduzida a sua utilização em produtos cárneos curados pelas autoridades competentes. Em contrapartida, essa redução em determinadas situações pode ser insuficiente para controlar o crescimento do *C. botulinum*, o que passa a ser preocupante do ponto de vista sanitário, e sugere a utilização de outros produtos associados ao nitrito para evitar tal problema (EFSA Journal, 2003; OLIVEIRA, ARAÚJO, BORG, 2005).

Segundo Jay, Loessner, Golden (2005) as nitrosaminas (estrutura  $\text{R}_2\text{N}-\text{N}=\text{O}$ ) são compostos orgânicos formados pela reação do nitrito com aminas secundárias

em meio fortemente ácido, sendo que 90% destes compostos são carcinogênicos. Devido a isto, a adição de sais de nitrito ou de nitrato tem sido muito discutível pela comunidade científica, e os valores utilizados destes conservantes têm sido reduzidos nas últimas décadas.

Para ocorrer a formação de nitrosaminas são necessárias condições específicas como:

- a) Presença de umidade em níveis elevados o suficiente para permitir as interações moleculares necessárias para reação;
- b) Valores de pH baixos o suficiente (como por exemplo o meio gástrico), para originar o ânion  $\text{NO}^+$ ;
- c) Reagentes em quantidades e disponibilidade suficientes (nitrito e aminas secundárias);
- d) Ausência de inibidores de reação, como ascorbato, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e bissulfito;
- e) Energia térmica (calor)

(FRIDMAN, MUKHAMETSHIN, NOVIKOV, 1971; FAN e TANNENBAUM, 1972; CRADDOCK, 1992).

Como método de inibição da formação de nitrosaminas em produtos cárneos, utilizam-se substâncias antioxidantes, como ácido ascórbico e seus isômeros e sais, como ascorbato de sódio, ácido eritórbito e eritorbato de sódio. Estes compostos reduzem a quantidade de nitrito residual e inibem a formação de compostos nitrosos. O ácido ascórbico ou ascorbato reduz o nitrito a  $\text{NO}_x$ , oxidando-se por sua vez a ácido dehidroascórbico. Já o ácido eritórbito e o eritorbato de sódio se combinam com o  $\text{NO}_x$  produzindo óxido nítrico, evitando a formação do ácido nitroso, o qual é um dos principais precursores do agente nitrosante anidrido nitroso, o qual reage com as aminas e aminoácidos da carne formando as nitrosaminas (DUTRA, RATH, REYES, 2007).

Em estudos realizados pela comunidade científica concluíram-se que apenas 5% da ingestão média de nitritos e de nitratos provém do consumo de produtos cárneos curados (PENNINGTON, 1998; WHO, 2010). Fontes de nitrito e nitrato vêm de diferentes origens e são influenciadas por hábitos culturais como estilo de vida e localização geográfica. O nitrato provém do consumo de algumas plantas como espinafre, couve, cenoura, cereais, rabanetes, devido ao uso de fertilizantes azotados

usados na agricultura para cultivar as mesmas. O nitrito provém principalmente da ingestão de produtos cárneos curados, e peixes defumados. Também o nitrito e o nitrato podem ser provenientes do consumo de água contaminada por fertilizantes. O comitê FAO/WHO (Food and Agriculture and Organization/World Health Organization de Peritos em Aditivos Alimentares) preconiza limites de IDA (ingestão diária aceitável) para íons nitrito de 0 – 0,07 mg/kg de peso corpóreo (WHO, 2003), e para nitrato 0 – 3,7 mg/kg de peso corpóreo (WHO, 1996). O nitrito é mais tóxico que o nitrato, pois este composto se distribui rapidamente por todo o organismo, podendo originar vaso dilatação e relaxamento da musculatura lisa. Ao chegar na corrente sanguínea, o nitrito pode reagir com a hemoglobina e provocar metahemoglobinemia, impedindo que ocorra o transporte normal do oxigênio. Segundo Roça (2000) uma dose única de nitrito maior que 15-20 mg/kg de peso vivo pode ser letal. Entretanto o nível permitido em produtos cárneos é de 20 a 40 vezes menor do que a dose letal, o que não constitui nenhum perigo de toxicidade, quando o nitrito é utilizado em níveis recomendados.

### 2.9.2 Função conservante do nitrito e nitrato

No final dos anos 50 descobriu-se que o nitrato não possuía nenhuma ação antibacteriana, sendo que é o nitrito que apresenta um papel importante na conservação de produtos cárneos curados (EFSA Journal, 2003). Conforme pode ser observado abaixo, Roça (2000) apresenta a reação de redução do  $\text{NaNO}_3$  a  $\text{NaNO}_2$  por ação de bactérias desnitrificantes:



O nitrato age como uma reserva de nitrito quando adicionado em produtos cárneos, pois o mesmo é reduzido por bactérias a nitrito. Como esta redução é um processo lento, para que a quantidade de nitrato reduzida seja significativa é necessário um número razoavelmente elevado de bactérias, o que poderia tornar-se prejudicial à saúde do consumidor (ROÇA, 2000). Como consequência deste fato, a indústria de produtos cárneos tem eliminado o uso de nitrato na maioria dos processos de cura de carnes. Na última década, o nitrato raramente tem sido utilizado em processos de cura rápida de carnes. O mesmo é apenas utilizado quando se tem um



processo de cura demorado, como na fabricação de salames, copas, presunto Parma, e *jerked beef*, onde o nitrato é transformado em nitrito pela ação bacteriana ao longo do tempo de cura, fazendo uma reposição do nitrito perdido neste mesmo processo (SEBRANEK e BACUS, 2007).

O nitrito é um forte inibidor do crescimento de bactérias anaeróbias como o *C. botulinum*. Também se mostra eficaz para o controle de outros microorganismos como *Listeria monocytogenes*, e em altas concentrações contra *S. aureus*. Contudo é ineficaz contra salmonelas e bactérias lácticas (JAY, LOESSNER, GOLDEN, 2005).

O mecanismo de ação do nitrito sobre os microorganismos ainda não está bem elucidado. Acredita-se que o nitrito inibe o crescimento do *C. botulinum*, pois o mesmo interfere nas enzimas ferro-enzofre, como a ferredoxina, impedindo a síntese da adenosina trifosfato (ATP) a partir do piruvato. Woods, Wood, Gibbs (1981) demonstraram que o sistema fosforoclástico do *C. botulinum* e do *C. sporogenes* é inibido com óxido nítrico devido à acumulação de ácido pirúvico no meio (JAY, LOESSNER, GOLDEN, 2005).

A reação fosforoclástica envolve a quebra do piruvato com fosfato inorgânico e coenzima-A produzindo acetilfosfato. Em presença de adenosina difosfato (ADP) se sintetiza o ATP a partir do acetilfosfato. Durante a quebra do piruvato, primeiro os elétrons se transferem para ferredoxina, e em seguida para o íon  $H^+$ , para formar o  $H_2$  em uma reação catalisada pela enzima hidrogenase. As enzimas ferredoxina e hidrogenase são proteínas não heme que contém complexos ferro-enzofre.

Reddy, Lancaster, Cornforth (1983) mostraram que o óxido nítrico (NO) reage com complexos ferro-enzofre formando ferro-nitrosil. A presença deste composto leva à destruição de enzimas ferro-enzofre, como a ferredoxina, presente no *C. botulinum*. Tompkin, Davison, Branen (1983) propuseram a hipótese de que o NO reage com o ferro das células vegetativas do *C. botulinum*, talvez o ferro da ferredoxina. Sabe-se que bactérias resistentes à ação do nitrito não possuem a enzima ferredoxina. Ainda que a verdadeira ação antimicrobiana do nitrito se baseia na sua redução a NO que vai inibir enzimas agindo sobre ligações ferro-enzofre das mesmas (JAY, LOESSNER, GOLDEN, 2005).

### 2.9.3 Aplicação e efeitos da utilização de nitrito em produtos cárneos

Pivnick et al. (1969) trabalhando com carne de porco curada, concluíram que na ausência de nitrito são necessárias concentrações acima de 6,1% de cloreto de sódio para evitar a produção de toxina botulínica, quando adicionados  $10^6$  esporos de *C. botulinum* por grama de carne.

Hustad et al. (1973) estudaram o efeito do nitrito e do nitrato de sódio em diferentes concentrações em salsichas incubando-se 620 esporos de *C. botulinum* tipos A e B por grama de produto a 27°C por 56 dias. Verificou-se que foi necessário a adição de 100 mg/kg de nitrito para evitar a produção de toxina durante o período de 56 dias, mesmo sendo encontrados apenas 3 mg/kg de nitrito no final deste período. Com 50 mg/kg observou-se a produção de toxina em uma amostra após 56 dias de estocagem. Para o nitrato foi observado que mesmo quando adicionado 450 mg/kg, sem adição de nitrito, ele não foi eficaz.

Hauschild, Jarvis, Raymond (1982) inocularam  $10^4$  esporos/g de *C. botulinum* em patê de fígado, com adição de 50, 100, 150 mg/kg de nitrito de sódio, e armazenaram o produto a 27°C. Verificaram que ao final de uma semana, houve a produção de toxina nas amostras com 50 e 100 mg/kg, e as amostras com 150 mg/kg ficaram tóxicas ao final de duas semanas.

Robinson, Gibson, Roberts (1982) observaram em salsicha de carne suína contaminadas com esporos de *C. botulinum* que:

- quanto maior o pH do produto final maior a probabilidade de produção de toxina botulínica. Em valores de pH entre 6,3 a 6,7 comparando-se com pH entre 5,3 a 6,4, a probabilidade de produção de toxina foi maior em todas as situações testadas;
- quanto maior a concentração de nitrito adicionado no produto menor é a probabilidade de produção de toxina;
- quanto maior a quantidade de sal adicionado menor a probabilidade de produção de toxina. Utilizaram-se concentrações de 2,5, 3,5 e 4,5% no produto;
- tratamento térmico maior no produto também reduz a probabilidade de produção de toxina. Foi observado que em tratamentos à 80°C/1h, a probabilidade foi menor que em tratamentos de 80°C/7min.

As diferenças de tempo encontradas acima para aparecimento da toxina botulínica foram explicadas por Gibson, Roberts, Robinson (1984), que preconizam

que o efeito inibidor do nitrito sobre o *C. botulinum* depende da combinação de vários fatores, como: pH, atividade de água, concentração de NaCl, quantidade de nitrito adicionado ao produto e concentração residual, quantidade de ferro presente na carne, número de esporos presentes, presença de outros aditivos (nitrato, fosfato, ascorbato), tratamento térmico aplicado, e temperatura de estocagem.

Amstalden, Serrano, Manhani (1997) avaliaram a formação de toxina botulínica em mortadela e presunto quando os mesmos foram contaminados com  $10^4$  esporos/amostra (aprox.14 esp./g) de *C. botulinum* tipos A e B, sendo os produtos armazenados em temperatura de 30°C. Na formulação destes produtos foram adicionados 200mg/kg de nitrito de sódio e 500mg/kg de eritorbato de sódio. Como resultado deste estudo verificaram que não foi evidenciada toxina botulínica nas amostras de mortadela após 28 dias de estocagem a 30°C, sendo neste período, o residual de nitrito igual a 1,6mg/kg. Para o presunto, após 12 dias de estocagem a 30°C ocorreu o aparecimento da toxina botulínica em uma amostra, quando o residual de nitrito atingiu o nível zero. Neste caso as condições sensoriais do produto tornam-se inaceitáveis.

#### 2.9.4 Alterações de nitrito e nitrato ao longo do tempo

O declínio da concentração de nitrito em produtos cárneos curados durante o processo de produção e vida de prateleira destes produtos depende de alguns fatores como: pH do meio, tempo entre a mistura do produto e o final do tratamento térmico, temperatura de acondicionamento do produto, carga microbiana presente na matéria prima, e adição de antioxidantes. Segundo Pardi et al. (1996) estima-se que 50% do nitrito adicionado é perdido em 24 horas e menos de 10% permanece após 7 dias.

Hustad et al. (1973) estudaram o declínio do nitrito em salsichas durante o armazenamento à 27°C, e concluíram que após a adição do nitrito à carne ocorre uma redução de 16%. Durante o processamento do produto ocorre mais uma redução de 51%, restando ao final do processo de fabricação apenas 33% da quantidade inicialmente adicionada. Ao final de 56 dias de estocagem permanece em média 2,5% do nitrito adicionado.

Estudos feitos por Kudryashov (2008) em salsichas armazenadas a temperatura de +2°C durante 60 dias, nas quais foram adicionadas diferentes quantidades de nitrito, demonstrou-se que 65% do nitrito adicionado foi reduzido durante o período de tempo que compreendeu a adição do mesmo até o final do tratamento térmico. Neste mesmo estudo, foi verificado que após 20 dias de armazenamento do produto restou apenas um terço da concentração presente após o final do tratamento térmico.

#### 2.9.5 Legislação sobre o uso de nitrito

A legislação vigente para o uso de conservantes e aditivos em produtos cárneos no Brasil é a Instrução Normativa n.º 51 do MAPA de 29/12/2006 (BRASIL, 2007), a qual tem como referência a Resolução MERCOSUL GMC nº 73/97. A IN 51 estabelece o limite residual máximo de 150mg/kg (150ppm) de nitrito (de sódio ou de potássio), ou 150 mg/kg para combinações de nitrito (de sódio ou de potássio) com nitrato (de sódio ou de potássio). Quando se utiliza nitrito de sódio mais nitrato, o valor residual deve ser sempre expresso em nitrito de sódio. Para converter o valor de nitrato de sódio obtido em nitrito deve-se dividi-lo por 1,231, e para converter o valor de nitrato de potássio deve-se dividi-lo por 1,4637. Este valor residual máximo deve ser analisado logo depois de embalado o produto (BRASIL, 2009).

No ano de 2009 foi publicado o Ofício Circular n.º 15/2009/GAB/DIPOA, o qual estabelece os procedimentos para registro e fiscalização com relação ao uso de conservantes em produtos cárneos. Este ofício determina que as empresas devem possuir autocontroles para garantir que o valor residual máximo de nitrito não seja ultrapassado. Também determina que em casos de violação dos níveis estipulados pela IN 51 de 29/12/2006 poderá ser solicitado o “*Recall*” dos produtos, e em caso de reincidência dos limites no mesmo produto ou no terceiro desvio em diferentes produtos, o estabelecimento será submetido a um regime especial de fiscalização pelo DIPOA, no qual pode ocorrer a suspensão total ou parcial da comercialização de produtos que levam em sua composição conservantes com limitação de uso, ou em casos mais sérios, o cancelamento do registro do produto (BRASIL, 2009).

Na TABELA 4 são apresentados os limites de uso para os conservantes nitrato e nitrito em produtos cárneos em alguns países.

TABELA 4 – LIMITES DE USO DE NITRITO E NITRATO EM ALGUNS PAÍSES EM PRODUTOS CÁRNEOS

País ou Bloco econômico	Órgão regulamentador	Limite permitido	Fonte
Mercosul	Mercosul GMC	Máx. 150ppm de nitrito no produto final	MERCOSUL (1997)
EU	Parlamento Europeu	Máx. 150ppm de nitrito adicionado ao produto	PARLAMENTO EUROPEU (2008)
EUA	FDA	Máx. 100ppm de nitrito no produto final	FDA (2014)
Canadá	Departamento de Justiça	Máx. 200ppm de nitrito adicionado ao produto	FERRACCIOLI (2012)
Japão	Ministry of Health, Labour and Welfare	Máx. 70ppm de nitrito no produto final Máx. 70ppm de nitrato no produto final	FERRACCIOLI (2012)
Austrália	Food Standards Agency	Máx. 125ppm de nitrito no produto final	FERRACCIOLI (2012)
México	Secretaría de Agricultura Y Ganadería	Máx. 200ppm de nitrito no produto final	FERRACCIOLI (2012)
Brasil	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	Máx. 150ppm de nitrito e nitrato no produto final (expresso em nitrito de sódio)	BRASIL (2007)

FONTE: BRASIL (2007); FDA (2014); FERRACCIOLI (2012); MERCOSUL (1997); PARLAMENTO EUROPEU (2008)

## 2.10 LACTATO DE SÓDIO

O lactato de sódio é um sal sódico do ácido láctico natural, produzido via fermentação de açúcares, principalmente de cana. Apresenta sabor salino suave, propriedades antimicrobianas e pH neutro. Sua fórmula molecular é  $\text{CH}_3\text{CHOHCOONa}$ , com peso molecular igual a 112,07. Sua comercialização é feita em solução aquosa a 60%. É um produto amplamente utilizado na indústria de alimentos e de cosméticos. Na indústria de alimentos com a finalidade de regulador de acidez e agente bactericida, e na indústria de cosméticos com a finalidade de maior hidratação e clareamento da pele (SAKOMOTO, 2009).

### 2.10.1 Mecanismos de ação do lactato de sódio

Segundo Shelef (1994) existem dois mecanismos mais aceitos para a ação bacteriostática do lactato de sódio que são: a formação de ácidos lipofílicos fracos que apresentam capacidade de atravessar a membrana celular em sua forma não dissociada, e no interior da célula dissociar-se, acidificando o meio. O segundo mecanismo baseia-se na capacidade do lactato em diminuir a atividade de água do alimento.

Para Shelef (1994) a primeira proposição baseia-se na diminuição do pH no interior da célula dos microorganismos. Isto ocorre, pois, os ácidos orgânicos lipofílicos na forma protonada, formados pelo lactato, conseguem penetrar livremente pela membrana citoplasmática acidificando o citoplasma celular. Para regular o pH no interior da célula, muita energia de ATP é liberada, pois é preciso retirar os prótons gerados pelos ácidos para o exterior da célula. Isto consome muita energia da célula, o que faz diminuir a taxa de crescimento dos microorganismos (figura 5). Este mesmo fenômeno causa interferência na permeabilidade da membrana citoplasmática, o que leva a distúrbios nas funções celulares, como por exemplo, no transporte de aminoácidos.

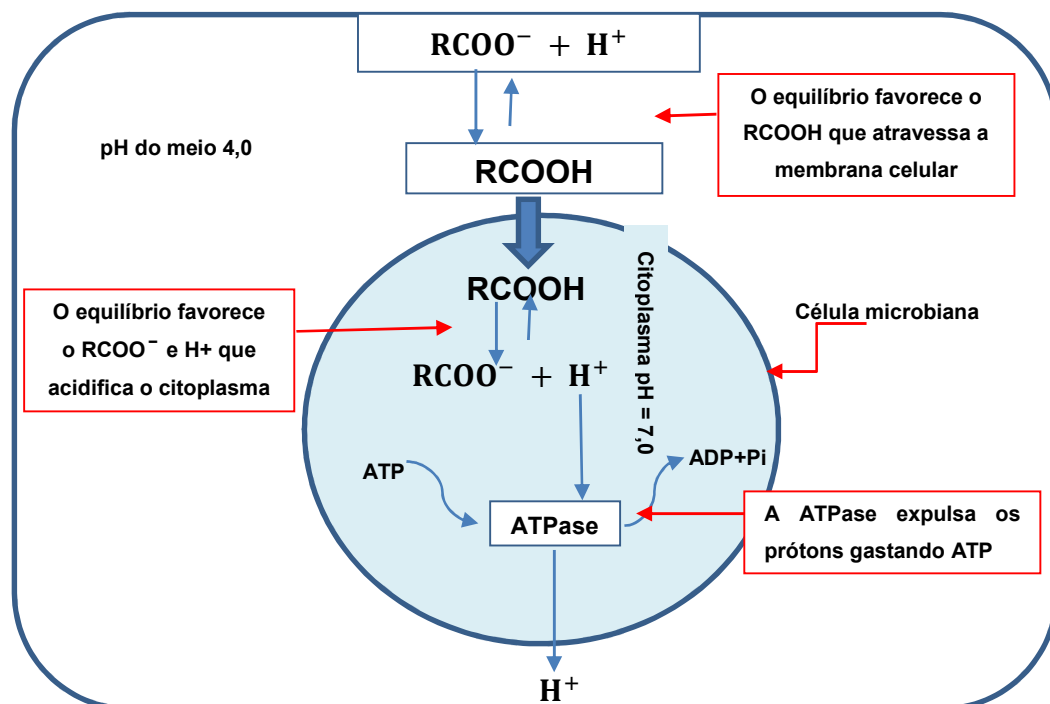


FIGURA 5 – ROTA DE UM ÁCIDO ORGÂNICO EM UM EXOPLASMA DE BAIXO pH EM PRESENÇA DE UMA CÉLULA MICROBIANA  
FONTE: DAVIDSON (2001)

A segunda proposição segundo Shelef (1994) relaciona a ação bacteriostática do lactato com a diminuição da atividade de água do alimento, o que aumenta a validade comercial do produto, pois diminui a taxa de crescimento microbiano em fase logarítmica.

#### 2.10.2 Aspectos legais sobre o uso de lactato de sódio

O uso de lactato de sódio em produtos cárneos foi autorizado no Brasil em 1990, pela secretaria de Inspeção de Produto Animal, através da SIPA-AUP nº 235/90. Seu emprego foi liberado como coadjuvante tecnológico na proporção máxima de 2% sobre o produto final (BRASIL, 1990). Em 1995 ocorreu a autorização pela Secretaria de Vigilância Sanitária, através da Portaria n.º 28 de abril de 1995, onde o lactato foi liberado sem limite máximo de aplicação, com a função umectante em embutidos (BRASIL, 1995). Em 1998 o uso do lactato como regulador de acidez para produtos cárneos industrializados, foi liberado sem limite de uso pela Portaria nº 1004 de 11 de dezembro de 1998 publicada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 1998). Em 2006 através da Instrução Normativa MAPA 51/2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento regulamentou definitivamente o uso de lactato como regulador de acidez sem limite de uso para produtos cárneos industrializados (BRASIL, 2007).

Segundo a “Food and Drug Administration” (FDA) o lactato é um alimento Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) e utilizado para o controle do crescimento de certos microorganismos durante a validade comercial, além de controlar o pH e o sabor de produtos cárneos (STEKELENBURG; KANT-MUERMANS, 2001). O grande limitante no uso do lactato de sódio é a obtenção de um produto final mais salgado, principalmente quando utilizado em concentrações acima de 4%.

### 2.10.3 Utilização de lactato de sódio em produtos cárneos

Vários estudos sobre a utilização do lactato de sódio em produtos cárneos e sua ação antimicrobiana sobre bactérias patogênicas, principalmente contra o *C. botulinum*, foram publicados.

Miller, Call, Whiting (1993) demonstraram que a adição de lactato de sódio a 2% em carne de peru foi responsável por inibir o crescimento do *C. botulinum*, bem como evitar a produção de toxina. Meyer et al. (2003) demonstraram que 2,5% de lactato de sódio adicionados em peito de peru cozido, sem adição de nitrito, conservado em temperatura ambiente, foram suficientes para aumentar de 8 para 22 dias o tempo para que esporos de *C. sporogenes* adicionados ao produto germinassem.

Houtsma et al. (1994) inocularam esporos de *C. botulinum* em meio de cultura com peptona e extrato de levedura. Na incubação a 15°C a produção de toxina ocorreu com 14 dias para 0% e 1% de lactato; para 2% de lactato, este tempo aumentou para 21 dias, e no meio contendo 3% de lactato não ocorreu formação de toxina ao final de 49 dias de incubação. Para a incubação a 20°C a formação de toxina ocorreu em menos de 5 dias no meio sem lactato, 11 dias para 1,5% de lactato, 15 dias para 2,5% de lactato, e não ocorreu crescimento ao final de 32 dias para o meio contendo 4% de lactato. Na incubação a 30°C, a produção de toxina no meio foi detectada com 11 dias de incubação para a concentração de 4% de lactato.

Maas, Glass, Doyle (1989) em seus estudos demonstraram que a adição de lactato de sódio retardou a formação de toxina pelo *C. botulinum* em peito de peru cozido embalado a vácuo, armazenado a 27°C. A toxicidade ocorreu em menos de 3 dias para o produto sem lactato, para 2% de adição ocorreu com 4 a 5 dias, para 2,5% com 4 a 6 dias, para 3% com 7 dias, e para 3,5% com 7 a 8 dias. Neste estudo, o único conservante adicionado foi o lactato de sódio.

Kalinowski e Tompkin (1999) demonstraram que 3,3% de lactato de sódio adicionados em peito de peru cozido armazenado em temperatura de 3,3°C inibiu o crescimento de *Clostridium thermocellum* durante 70 dias, sendo que o produto sem lactato apresentou crescimento da bactéria com 5 dias. Unda, Molins, Walker (1991) comprovaram em seus estudos que 2% de lactato inibiram o crescimento de *C. sporogenes*.



Juneja e Thippareddi (2004) concluíram em seus estudos que a adição de 2% de lactato de sódio em peito de peru cozido foi suficiente para evitar o crescimento do *C. perfringens* durante o resfriamento de 21 horas após o cozimento (resfriamento de 54,40°C para 7,20°C). Neste estudo, foram adicionados 2,80 log<sub>10</sub> esporos de *C. perfringens* por grama de produto. Para o produto sem adição de lactato (controle) ocorreu um crescimento para 6,6 log<sub>10</sub> UFC/g durante o resfriamento, e para o produto com lactato não houve nenhum aumento.

## 2.11 ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPECIARIAS

Segundo FDA (Food and Drug Administration) os condimentos são definidos como produtos aromáticos de origem vegetal utilizados com a finalidade principal de temperar alimentos. Existem relatos da utilização destes produtos e seus componentes oleosos em alimentos desde a cultura mesopotâmica 5000 AC (UPNMOOR, 2003). Na última década tem se buscado a utilização de produtos naturais com objetivo de melhor conservar os alimentos. Este fato decorreu devido ao uso incorreto, ou abusivo, de produtos químicos, os quais podem provocar muitos efeitos colaterais aos consumidores, como doenças carcinogênicas (OLIVEIRA, 2010).

Os OE's são também definidos como uma parte do metabolismo (combinação de metabólitos) de um vegetal, compostos geralmente por terpenos que estão associados ou não a outros componentes, cuja maioria são voláteis, e geram em conjunto, o odor característico do vegetal (BANDONI e CZEPAK, 2008).

Um grande número de pesquisas tem relatado as propriedades antibacterianas e antifúngicas de especiarias *in natura*, de seus óleos essenciais e seus extratos. Várias plantas utilizadas para aromatizar alimentos apresentam atividade antimicrobiana, como por exemplo, louro, manjerona, manjeriço, cravo, canela, alho, orégano, coentro, alecrim, entre outras (BEUCHAT e GOLDEN, 1989).

### 2.11.1 Métodos de extração de óleos essenciais

Os OE's são líquidos oleosos aromáticos obtidos de material vegetal como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos, e raízes. Vários métodos de extração de OE's têm sido utilizados nesta última década, porém o método a ser utilizado depende da localização do óleo volátil na planta e de qual sua proposta de utilização. As técnicas de extração estão cada vez mais aperfeiçoadas e permitem a obtenção de OE's com pureza e composição desejada (ARIDOGAM et al., 2002; SIMÕES et al., 2007). Dentre os principais métodos tem-se:

- a) **Enfloração:** pouco utilizado, produz OE's de alto valor comercial. Mais utilizado por indústrias de perfumaria que extraem o óleo volátil de pétalas de flores. O método consiste em colocar as pétalas de flores sobre uma camada de gordura, em temperatura ambiente por um determinado período de tempo, até as mesmas se esgotarem, e ser substituídas por outras. Quando ocorrer a saturação total, a gordura é tratada com álcool, que posteriormente é destilada a baixa temperatura (SIMÕES et al., 2007).
- b) **Arraste por vapor d'água:** é o processo mais simples, mais seguro e mais antigo utilizado. O método é uma destilação de dois líquidos imiscíveis, e basicamente consiste em vaporizar cada um dos componentes em temperaturas inferiores à de ebulição, por efeito de uma corrente direta de vapor. Este tem a função de aquecer a mistura até a temperatura de ebulição, e diminuir a temperatura de ebulição por se adicionar pressão de vapor que se injeta nos componentes voláteis dos óleos essenciais. Os vapores que saem do “pescoço de ganso” são resfriados em um condensador, e depois separados em um decantador florentino (BANDONI e CZEPAK, 2008).
- c) **Extração com solventes orgânicos:** Neste processo, os OE's são extraídos por solventes apolares, porém os mesmos não extraem apenas óleos voláteis, mas também outros compostos lipofílicos (SIMÕES et al., 2007). Segundo Packiyasothy e Kyle (2002) o produto obtido neste método apresenta uma melhor atividade antimicrobiana quando comparado com o produto extraído por vapor.
- d) **Prensagem:** utilizada para extrair óleos voláteis de frutos cítricos. Os pericarpos destes frutos são prensados e a camada que contém o óleo volátil é separada.

Posteriormente o óleo é separado da emulsão formada com água através de decantação, centrifugação, ou destilação fracionada (SIMÕES et al., 2007).

- e) **Extração por CO<sub>2</sub> supercrítico:** é um método que apresenta um maior custo, porém permite recuperar aromas naturais de vários tipos e não somente de óleos voláteis. É um método bastante eficiente, e recentemente muito utilizado para extração de óleos voláteis. Possui a grande vantagem de não possuir nenhum traço de solvente no produto final, quando comparado com outros métodos. O processo consiste em inicialmente liquefazer o CO<sub>2</sub> aplicando-se uma compressão, e em seguida, aquecê-lo a uma temperatura superior a 31°C. Nestas condições, o CO<sub>2</sub> possui a viscosidade análoga de um gás, e a capacidade de dissolução idêntica à de um líquido. Após a extração, faz-se o CO<sub>2</sub> retornar à condição de gás resultando na sua completa eliminação da solução (SIMÕES et al., 2007).

#### 2.11.2 Componentes químicos presentes em OE's

Óleos essenciais são misturas complexas de componentes naturais, as quais podem conter de 20 a 60 componentes em concentrações variáveis. De dois a três compostos majoritários presentes na proporção entre 20 a 70% são os que caracterizam os OE's, sendo os outros componentes presentes em menores concentrações, ou em pequenos traços (BAKKALI et al., 2008). Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre (SIMÕES et al., 2007). Wilkins e Board (1989) relataram que mais de 1340 diferentes plantas possuem componentes antimicrobianos.

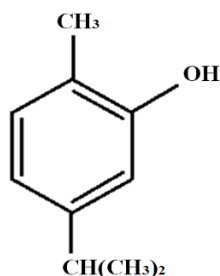
Os compostos fenólicos são os principais componentes nos OE's responsáveis por sua atividade antimicrobiana (COSENTINO et al., 1999). A tabela 5 apresenta os principais componentes com propriedades antimicrobianas, de alguns óleos essenciais.

TABELA 5 - PRINCIPAIS COMPONENTES DE ALGUNS OE'S QUE POSSUEM PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS

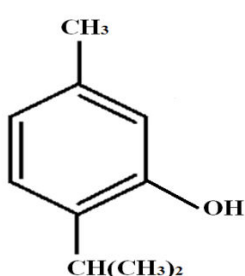
Nome comum	Nome científico	Principais componentes	Composição aproximada	Referência
<b>Coentro</b>	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalol	70%	Delaquis et al., 2002.
<b>Alecrim</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	$\alpha$ -pineno acetato de bornila cânfora 1,8 cineole	2-25% 0-17% 2-14% 3-89%	Daferera et al., 2000, 2003; Pintore et al, 2002.
<b>Orégano</b>	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol Timol Y-terpinene p-cimeno	Traços-80% Traços-64% 2-52% Traços-52%	Daferera et al., 2000; Demetzos e Perdetzoglou, 2001; Marino, Bersani, Comi, 2001.
<b>Sálvia</b>	<i>Salvia officinalis</i>	Cânfora $\alpha$ -pineno $\beta$ -pineno 1,8 cineole $\alpha$ -tujone	6-15% 4-15% 2-10% 6-14% 20-42%	Marino, Bersani, Comi, 2001.
<b>Canela</b>	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Tras-aldeído cinâmico	65%	Lens-Lisbonne et al., 1987.
<b>Cravo</b>	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol Acetato de eugenilo	75-85% 8-15%	Bauer, Garbe, Surburg, 2001

FONTE: BURT (2004)

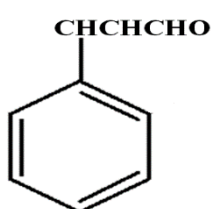
A figura 6 apresenta as estruturas químicas de alguns componentes de óleos essenciais com atividade antimicrobiana



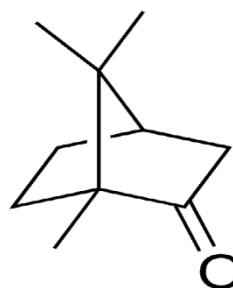
carvacrol



timol



aldeído cinâmico



cânfora

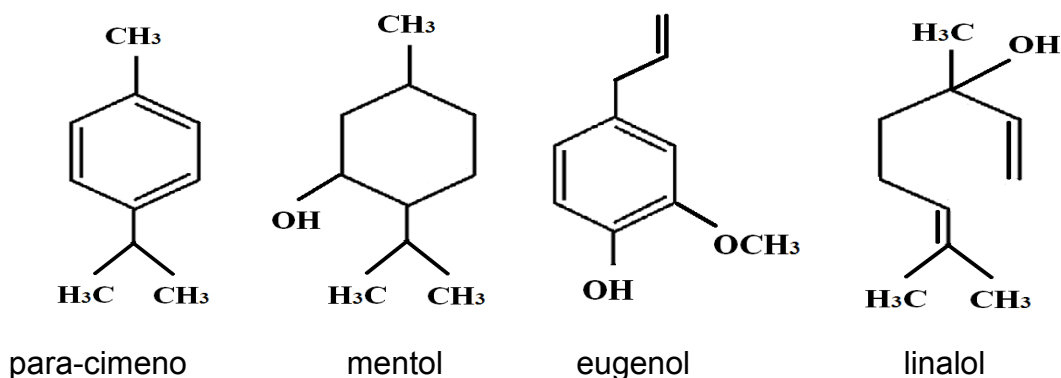


FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS COMPONENTES DE ÓLEOS ESSENCIAIS  
 FONTE: BURT (2004); VIGIL, PALOU, ALZAMORA (2005); BAKKALI et al. (2008)

A composição química dos óleos essenciais de uma determinada planta varia conforme a região geográfica onde a mesma é cultivada (tipo de solo, temperatura, umidade relativa, tempo de exposição ao sol, etc.), e conforme a temporada de colheita. Geralmente OE's produzidos de ervas colhidas durante ou logo após a floração possuem uma maior atividade antimicrobiana (MARINO, BERSANI, COMI, 1999). A composição de OE's de diferentes partes da mesma planta também pode variar significativamente. Por exemplo, o óleo essencial obtido das sementes de coentro tem uma composição bastante diferente do obtido de suas folhas, coletados de uma mesma planta (DELAQUIS et al., 2002).

### 2.11.3 Mecanismo de ação e atividade antimicrobiana dos OE's

Segundo Vigil, Palou, Alzamora (2005) alguns OE's de especiarias podem ter um amplo espectro antimicrobiano, outros podem ser específicos contra certos grupos de microorganismos, como bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, ou somente atingir bactérias e não ter eficácia contra fungos ou leveduras. Devido à existência de um grande número de diferentes grupos de componentes químicos nos OE's, é mais provável que a atividade antimicrobiana não seja atribuída a um mecanismo de ação específico, mas sim a vários alvos na célula microbiana (SKANDAMIS e NYCHAS, 2001; CARSON, MEE, RILEY, 2002).

Na figura 7 são mostrados os locais da célula bacteriana que são considerados sítios de ação para os OE's. Geralmente os mecanismos de ação dos compostos naturais são desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios serem afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

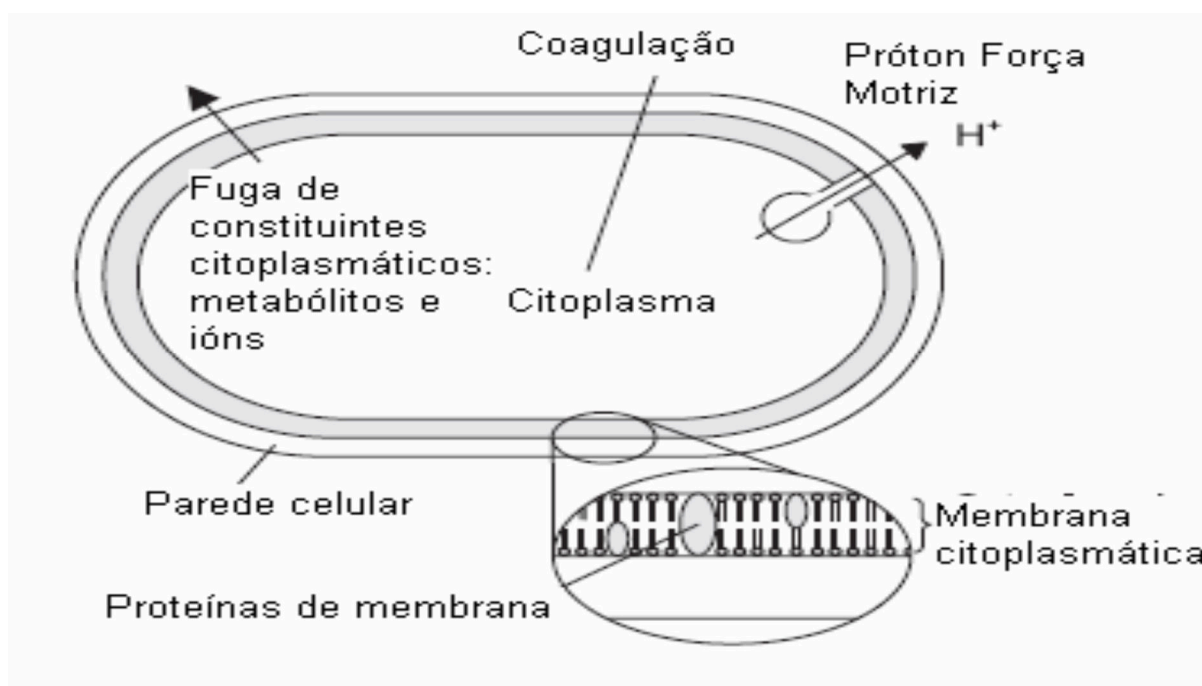


FIGURA 7 - LOCAIS E MECANISMOS DE AÇÃO QUE PODEM SER SÍTIOS PARA AÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NA CÉLULA BACTERIANA  
FONTE: BURT (2004)

Uma importante característica responsável pela ação antimicrobiana que os óleos essenciais apresentam é a sua hidrofobicidade, a qual permite a partição dos lipídios da membrana celular bacteriana desintegrando sua estrutura e tornando-a mais permeável (SIKKEMA, BONT, POOLMAN, 1994). Prindle e Wright (1977), mencionaram que o efeito dos componentes fenólicos dos óleos essenciais depende de sua concentração. Em baixas concentrações os mesmos afetam a atividade enzimática, principalmente das enzimas associadas com a produção de energia. Já em altas concentrações os componentes fenólicos (carvacrol, timol, mentol, eugenol, etc) causam desnaturação proteica da parede celular. Os componentes fenólicos também podem desnaturar enzimas responsáveis pela germinação de esporos, ou

interferir com os aminoácidos necessários para os processos de germinação (NYCHAS, 1995; RICO-MUÑOZ, BARGIOTA, DAVIDSON, 1987).

Estudos sugerem que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é maior contra bactérias Gram-positivas, do que contra as Gram-negativas. Isto ocorre provavelmente devido à estrutura da parede celular das Gram-negativas ser mais complexa por apresentar uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos, a qual restringe a difusão de compostos hidrofóbicos. Já as Gram-positivas possuem uma parede celular simples composta por glicoproteínas e ácidos teicoicos (LAMBERT et al., 2001; VANDAR-UNLU et al., 2003; WALSH et al., 2003). Entretanto nem todos os estudos com OE's mostram que as Gram-positivas são mais susceptíveis aos óleos essenciais, conforme Burt (2004). Deans e Ritchie (1987) testaram 50 OE's comerciais contra 25 espécies de bactérias e não encontraram evidências de diferença de sensibilidade entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Um estudo posterior feito por Dorman e Deans (2000) usando o mesmo método de ensaio e as mesmas espécies de bactérias, mas usando óleos essenciais recém extraídos concluíram que de fato as bactérias Gram-positivas eram mais sensíveis a dois OE's testados, e igualmente sensíveis a 4 outros OE's, comparando-se com as bactérias Gram-negativas. Eles postularam que diferentes componentes dos óleos essenciais exibem diferentes graus de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e sabe-se que a composição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com a época de colheita ou região geográfica em que foi produzida. Esta variação de cada lote de OE's é suficiente para que ocorra variabilidade na atividade antimicrobiana nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Farag et al. (1989) estudaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de sálvia, cravo, alecrim, tomilho, e cominho em espécies Gram-positivas e Gram-negativas. Eles observaram que os OE's e seus principais componentes de sálvia, cominho e alecrim apresentaram nenhum ou mínimo efeito sobre as bactérias Gram-negativas. Os óleos de cravo e tomilho na concentração de 0,75-1,5 mg por mL foram fortemente eficazes contra o *S. aureus* e *Micrococcus spp*, e mostraram zonas reduzidas de inibição para bactérias Gram-negativas. Em um estudo com óleo essencial de hortelã, o mesmo mostrou-se mais eficaz na redução de células viáveis de *Salmonella enteritidis* do que de *L. monocytogenes* (TASSOU, DROSINOS, NYCHAS, 1995).

A composição, as estruturas, bem como grupos funcionais dos óleos essenciais desempenham um papel importante na atividade antimicrobiana. Componentes com estrutura fenólica, como carvacrol, eugenol, timol são mais efetivos (DORMAN E DEANS (2000). Óleos com alto nível de eugenol, aldeído cinâmico e citral são fortes antimicrobianos. A atividade da sálvia e do alecrim está relacionada com a presença de borneol, os constituintes fenólicos carvacrol, p-cimeno e timol, são provavelmente responsáveis pela atividade do orégano, tomilho e segurelha (DAVIDSON e NAIDU, 2000).

#### 2.11.4 Efeito sinérgico e antagônico entre os componentes de OE's, e dos mesmos com conservantes alimentares e outros métodos de preservação

Quando a combinação das substâncias de um determinado óleo essencial possui um efeito antimicrobiano maior do que quando se utiliza apenas um componente ocorre um sinergismo. Se o efeito de apenas um componente é maior que o uso do óleo essencial tem-se um antagonismo entre os componentes químicos (BURT, 2004). Alguns estudos mostram que os OE's integrais possuem maiores propriedades antimicrobianas do que seus principais componentes misturados. Isto mostra que os componentes minoritários possuem efeito sinérgico com os componentes principais, pois potencializam a sua ação (MOUREY e CANILLAC, 2002; GILL et al., 2002). Segundo Bakkali et al. (2008) os OE's para fins biológicos devem ser estudados em sua forma integral, em vez de apenas seus componentes majoritários, pois o sinergismo de seus componentes faz com que os OE's sejam bem mais eficazes para fins biológicos.

Lambert et al. (2001) verificaram sinergismo entre os dois principais componentes do OE de orégano, carvacrol e timol, quando testados contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Ultee et al. (2000) encontraram sinergismo entre o carvacrol e seu precursor p-cimeno, quando testado contra o *B. cereus*. Segundo o autor o p-cimeno é um antibacteriano muito fraco, porém o mesmo incha as membranas das células bacterianas facilitando o transporte do carvacrol para dentro das células, resultando então em um sinergismo entre os dois componentes.



Moleyar e Narasimham (1992) em seus estudos concluíram que a combinação de aldeído cinâmico com eugenol na concentração de 250 e 500 µg/mL inibiram completamente por mais de 30 dias o crescimento de *Staphylococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, e *Enterobacter sp.*, sendo que os substratos utilizados individualmente (agar nutriente) não inibiram seu crescimento.

Também a tecnologia de “obstáculos ou barreiras” a qual preconiza a utilização de técnicas de preservação múltiplas e simultâneas para controle de patógenos em alimentos durante sua vida de prateleira, tem sido utilizada com sucesso (LEISTNER, 2000). Vários sinergismos potenciais entre OE's e outros métodos de preservação tem sido sugerido, dentre eles temos: baixo pH, baixa atividade de água, baixa tensão de oxigênio, baixa temperatura de armazenamento, utilização de outras substâncias antimicrobianas, utilização de substâncias quelantes, tratamentos térmicos moderados e elevada pressão (GOULD, 1996; VIGIL, PALOU, ALZAMORA, 2005).

NaCl tem demonstrado tanto sinergismo como antagonismo quando combinado com OE's. Tassou, Drosinos, Nychas (1995) demonstraram o sinergismo entre óleo de hortelã e NaCl contra de *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes*. O uso combinado de 2-3% de NaCl com 0,5% de cravo em pó em extrato contendo músculo de cavala impediu totalmente o crescimento e a produção de histamina pela *Enterobacter aerogenes*. O mecanismo proposto para o efeito sinérgico é que o eugenol aumenta a permeabilidade da parede celular, e posteriormente o NaCl age sobre as enzimas intracelulares inibindo seu crescimento (WENDAKOON e SAKAGUCHI, 1993). Efeito antagônico foi observado entre o sal com carvacrol e p-cimeno contra o *B. cereus* em arroz. Apesar do carvacrol e p-cimeno possuírem efeito sinérgico a adição de sal na concentração de 1,25 g/L de arroz reduziu este sinergismo. No mesmo estudo molho de soja também apresentou sinergismo com carvacrol, porém a adição de NaCl anulou esta sinergia (ULTEE, et al., 2000).

A ação sinérgica entre óleo de orégano e nitrito de sódio e seus efeitos sobre o crescimento e a produção de toxina do *C. botulinum* foi estudada por Ismaiel e Pierson (1990). Neste estudo foi verificado que o óleo de orégano atuou sinergicamente com o nitrito de sódio para evitar o crescimento do *C. botulinum* em caldo de carne, enquanto que somente o óleo de orégano aplicado isoladamente em concentrações de até 400 ppm não apresentou nenhum efeito inibidor significativo. O

mecanismo proposto de sinergismo depende do óleo de orégano reduzir o número de esporos que germinam e do nitrito de sódio inibir o crescimento de esporos. Ambas as substâncias afetam o crescimento das células vegetativas (ISMAIEL e PIERSON, 1990). Cui, Gabriel, Nakano (2010) estudaram a eficácia de vários extratos de plantas combinados com nitrito de sódio contra o *C. botulinum*. Neste estudo foi verificado o sinergismo entre 10ppm de nitrito com 0,05% de extrato de noz-moscada, com 0,02% de sálvia, e com 0,05% de extrato de cravo.

Skandamis e Nychas (2001) relataram em seus estudos que óleo essencial de orégano retardou o crescimento microbiano e suprimiu as contagens de microorganismos deteriorantes em carne moída de bovino embalada com atmosfera modificada (40% de CO<sub>2</sub>, 30% de N<sub>2</sub>, e 30% de O<sub>2</sub>), quando comparadas com a mesma situação embalada em atmosfera comum.

Periago, Palop, Fernandez (2001) reportaram que a utilização simultânea de 0,15 µg/mL de nisina com 0,3 m mol/L ou 45 µg/mL de carvacrol ou timol, causou um declínio maior na contagem de células viáveis de *B. cereus*, quando comparado com a utilização dos agentes antimicrobianos aplicados individualmente. Em pH 7 a ação sinérgica entre o carvacrol e a nisina foi significativamente maior em temperatura de 30°C do que em 8°C, o que indica que a temperatura induz mudanças na permeabilidade da membrana citoplasmática (PERIAGO e MOEZELAAR, 2001).

A atividade dos OE's também é afetada pelo grau de oxigênio que está disponível. Isto se deve ao fato de que quando pouco oxigênio está disponível menos alteração oxidativa pode ocorrer nos OE's, e/ou que células que obtêm energia via metabolismo anaeróbio são mais sensíveis à ação tóxica dos OE's (PASTER et al., 1990). A atividade antimicrobiana do orégano e tomilho foi bastante reforçada contra *Salmonella. typhimurium* e *Staphylococcus aureus* em níveis baixos de oxigênio (PASTER et al., 1990). OE's de orégano em combinação com embalagem em atmosfera modificada tem um aumento efetivo no *shelf life* de carne de frango fresca (CHOULIARA et al., 2007). O uso de embalagem a vácuo em combinação com óleo essencial de orégano pode ter um efeito sinérgico sobre a inibição de *Listeria monocytogenes* e a flora deteriorante em filés de carne bovina. A adição de 0,8% de óleo de orégano alcançou uma redução de 2-3 ciclos logarítmicos na flora microbiana inicial, mas foi mais efetivo em amostras embaladas a vácuo em filme com baixa permeabilidade, quando comparados com amostras armazenadas aerobicamente, ou

embaladas a vácuo em filme com alta permeabilidade (TSIGARIDA, SKANDAMIS, NYCHAS, 2000).

#### 2.11.5 Carvacrol e timol

O carvacrol é o principal componente dos óleos essenciais de orégano e tomilho, sendo o componente que mais tem recebido atenção dos pesquisadores. O timol possui estrutura química bastante semelhante ao carvacrol, tendo apenas um grupo hidroxila em local diferente no anel fenólico. Ambos os compostos parecem tornar a membrana celular mais permeável (LAMBERT et al., 2001).

Carvacrol e timol são capazes de desintegrar a membrana exterior de bactérias Gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos, e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática. A presença de cloreto de magnésio não tem mostrado nenhuma influência nesta ação, sugerindo então que ocorre um mecanismo diferente da quelação de cátions na membrana externa (HELANDER et al., 1998).

Estudos com *B. cereus* mostraram que o carvacrol interage com a membrana celular onde se dissolve na bicamada fosfolipídica, e supõem-se alinhar-se entre as camadas de ácidos graxos. Esta distorção da estrutura física causa expansão e desestabilização da membrana, aumentando sua fluidez, e por consequência sua permeabilidade. Esta maior fluidez da membrana celular em presença de carvacrol foi confirmada medindo-se a temperatura média de transição de fase dos lipídeos bacterianos (ULTEE et al., 2000a).

Medidas de ATP no interior da célula em presença de carvacrol têm sido realizadas, e verificou-se que ocorreu uma diminuição do nível de ATP no interior da célula. Presume-se então que a taxa de síntese de ATP foi reduzida, ou que a taxa de hidrólise de ATP foi aumentada (BURT, 2004). Em presença de carvacrol foi observada uma diminuição da força próton motriz (FPM), formando poros através da interação com fosfolipídios da membrana citoplasmática. Os autores concluíram também que o potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) diminuiu, e o gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) cessou completamente, causando o fluxo de íons de potássio para fora da célula (BURT, 2004).

A presença de carvacrol também faz diminuir a presença de íons de fosfato no interior da célula bacteriana. Puderam então concluir que o carvacrol forma poros através da membrana celular permitindo que os íons deixem o citoplasma (ULTEE, 2000; LAMBERT et al., 2001).

Além do carvacrol inibir o crescimento de células bacterianas vegetativas, também tem se estudado sua eficácia contra produção de toxinas. Carvacrol é capaz de inibir a produção de toxina pelo *B. cereus* em caldos e sopas. Duas teorias podem explicar o modo de ação para inibir a produção de toxina: existência de ATP ou FPM insuficiente para exportar a toxina da célula, ou devido à baixa disponibilidade de energia as células a utilizam toda para sustentar sua viabilidade, restando muito pouca energia para produção de toxinas (ULTEE e SMID, 2001).

Juven et al. (1994) estudaram a ação do timol contra *S. typhimurium* e *S. áureos*, e apresentaram a hipótese de que o timol se liga as proteínas da membrana celular hidrofobicamente mudando assim as características de permeabilidade da membrana. Também verificaram que o timol foi mais eficaz em pH 5,5 que em pH 6,5. Isto ocorre, pois em pH 5,5 a molécula de timol está não dissociada, sendo então mais hidrofóbica, ligando-se melhor na parte hidrofóbica das proteínas, e dissolve-se melhor na parte lipídica.

#### 2.11.6 Eugenol

É o principal componente do óleo de cravo, cerca de 85%, também é encontrado em menor proporção (8%) no óleo de canela (FARAG et al., 1989). Doses sub-letais de eugenol foram encontradas por Thoroski, Blank, Billaderis (1989) para inibir a produção de amilases e proteases pelo *B. cereus*. Também foi notada uma degradação da parede celular. O grupo hidroxila do eugenol também se pode ligar às proteínas da parede celular, prevenindo a ação enzimática ((WENDAKOON e SAKAGUCHI, 1995).

#### 2.11.7 p-cimeno

É o precursor biológico do carvacrol, é hidrofóbico e causa inchaço na membrana citoplasmática facilitando a passagem do carvacrol pela membrana celular bacteriana. P-cimeno não possui ação efetiva antimicrobiana quando utilizado sozinho. A eficiência do p-cimeno quando incorporado na bicamada lipídica do *B. cereus*, deve-se muito provavelmente, por facilitar o transporte do carvacrol através da membrana citoplasmática (ULTEE, BENNINK, MOEZELAAR, 2002).

#### 2.11.8 Carvone

Quando testado em um sistema modelo de lipossomas, em concentrações acima da concentração inibitória mínima (CIM) verificou-se uma diminuição do gradiente de pH da membrana celular. A taxa específica de crescimento de *E. coli*, *Streptococcus thermophilus*, e *L. lactis* diminuiu com o aumento da concentração de carvone, o que sugere que ele atua perturbando o metabolismo de energia das células (OOSTERHAVEN, POOLMAN, SMID, 1995). Em contraste com o estudo acima, outro estudo constatou que o carvone foi ineficaz na membrana celular externa de *E. coli* e *S. typhimurium*, e não afetou o nível de ATP intracelular (HELANDER et al., 1998).

#### 2.11.9 Aldeído cinâmico

Principal componente do óleo essencial de canela, onde é encontrado em concentrações acima de 65%. O aldeído cinâmico é conhecido por ser o inibidor de crescimento de *E. coli* e *S. typhimurium* em concentrações similares ao carvacrol e timol, porém sabe-se que os mesmos não desintegram a membrana citoplasmática, e não afetam o ciclo de ATP intracelular (HELANDER et al., 1998). Seu grupo carbonila liga-se as proteínas da membrana citoplasmática impedindo a ação da enzima descarboxilase em *Enterobacter aerogenes* (WENDA KOONA e SAKAGUCHI, 1995).

#### 2.11.10 Aspectos legais para o uso de OE's em alimentos

Vários componentes de OE's foram registrados pela Comissão Europeia para utilização em alimentos, sendo que os mesmos não apresentam qualquer risco à saúde dos consumidores. Dentre eles temos: carvacrol, aldeído cinâmico, citral, p-cimeno, eugenol, mentol, limoneno, timol, carvona (BURT, 2004). Novos aromas só poderão ser registrados após a realização de estudos toxicológicos e metabólicos, sendo necessário certo investimento financeiro (REGULATION (EC) N.º 622/2002; REGULATION (EC) N.º 2232/96). Os aromatizantes permitidos estão listados na "Everything Added to Food in the US" (EAFUS), o que significa que o FDA (Food Drug Administration) considera estas substâncias como alimentos seguros (GRAS), ou como aditivo alimentar aprovado (BURT, 2004). São considerados tóxicos, e sua utilização em alimentos é proibida pela Comissão Europeia, as substâncias metil eugenol e estragol (BURT, 2004).

No Brasil, o uso de aditivos aromatizantes é regulamentado pela RDC n.º 02, de 15/01/2007 da ANVISA. Os aromatizantes autorizados são definidos pela lista base ou de referência, onde são contemplados todos os componentes aromatizantes com uso aprovado no Brasil. Para fazer parte desta lista os componentes devem ser aprovados por no mínimo uma das entidades: JECFA, UE (CoE), FDA ou FEMA. Na RDC n.º 02 também estão listadas as espécies botânicas de origem regional aprovadas para uso em alimentos, bem como seus componentes que apresentam limitações (BRASIL, 2007a).

#### 2.11.11 Aspectos sensoriais

Um dos maiores problemas encontrados na utilização dos OE's como conservador em alimentos são as alterações das características sensoriais, de modo negativo, devido em alguns casos ser necessário a utilização de elevadas concentrações para atingir o efeito antimicrobiano desejado (MEJLHOLM e DALGARD, 2002; SMITH et al., 2005). Tsigarida, Skandamis, Nychas (2000) utilizaram de 0,8% (v/p) de óleo de orégano em filés de carne bovina, e após

armazenamento à +5°C e cocção verificaram que o sabor dos mesmos foi aceitável. Skandamis e Nychas (2001) avaliaram a cor, sabor, e odor de carne moída de bovino contendo 1% (v/p) de óleo de orégano, estocada sobre atmosfera modificada e embalada a vácuo a +5°C, e verificaram que as três características foram afetadas positivamente durante a estocagem. Após cozimento os autores relataram que as alterações foram quase imperceptíveis.

Óleo de orégano em filé de bacalhau (0,05% v/p) produziu um sabor mais agradável, o qual foi decrescendo durante o tempo de armazenamento a +2°C (MEJLHOLM e DALGARD, 2002). Óleos de tomilho e orégano espalhados sobre o Robalo asiático na concentração de 0,05% imprimiram um odor de ervas, que durante o armazenamento por 33 dias, em temperatura entre 0 a 2°C, tornou-se mais pronunciado (HARPAZ et al., 2003).

Modelos “*in vitro*” utilizando óleos essenciais como agentes antimicrobianos para controle de microorganismos patógenos e deteriorantes precisam ser melhor avaliados utilizando modelos que realmente representem a verdadeira composição do alimento. Em geral nos modelos reais são necessárias concentrações mais elevadas de OE's para obter-se a mesma atividade antimicrobiana, quando comparados com modelos “*in vitro*”. Isto ocorre, pois muitos componentes presentes nos alimentos (água, proteínas, lipídeos, carboidratos) diminuem a eficiência dos agentes antimicrobianos naturais (GLASS e JOHNSON, 2004; DEVLIEGHERE, VERMEULE, DEBEVERE 2004). Segundo Aureli, Costantini, Zolea (1992) elevados níveis de proteínas e/ou lipídeos nos alimentos parecem proteger aos microorganismos da ação dos óleos essenciais.

Leuschner e Ielsch (2003) concluíram em seus estudos que é necessário aumentar a quantidade de condimentos utilizados no alimento, para obter o mesmo resultado obtido em testes “*in vitro*”. Em seus estudos verificaram que 1% de alho, cravo fresco, e pimenta vermelha seca apresentaram efeito listericida em meio de cultura, porém não apresentaram nenhum efeito quando utilizados em queijo tipo *soft*. Para obter-se o mesmo efeito antimicrobiano de óleos essenciais “*in vitro*” em matrizes alimentares são necessárias maiores quantidades. Em leite desnatado a concentração deve ser duas vezes maior (KARATZAS et al., 2001), dez vezes maior em salsichas (PANDIT e SHELEF, 1994), 50 vezes maior em sopas (ULTEE e SMID, 2001), e de 25 a 100 vezes maior em queijos (MENDOZA-YEPES et al., 1997).

### 2.11.12 Utilização de OE's em produtos cárneos

Tem se demonstrado que OE's de plantas são uteis para redução de patógenos em produtos cárneos, porém alguns autores têm registrado efeitos antimicrobianos baixos nestes produtos (GROSSO et al., 2008). O alto teor de gordura presente em produtos cárneos tem efeito negativo sobre a atividade antimicrobiana dos OE's. Este fato pode ser atribuído a maior solubilidade dos OE's na parte lipídica, do que na parte aquosa do alimento (BURT, 2004; LIS-BAUCHIN, STEYRL, KRENN, 2003). Lis-Bauchin, Steyrl, Krenn (2003) combinaram 1% de óleo de cravo e orégano, e verificaram que a combinação mostrou efeito inibidor contra *L. monocytogenes* em meio de cultura, porém quando a combinação foi aplicada em pasta de carne não ocorreu o efeito inibidor.

Segundo Burt (2004) eugenol e óleos essenciais de coentro, cravo, orégano e tomilho, quando utilizados em produtos cárneos na concentração de 5-20 µL/g apresentaram alto efeito contra *L. monocytogenes*, *A. hydrophila*, e no controle da flora deteriorante, as vezes causando até uma redução do número de células viáveis. O mesmo autor também cita que óleos de menta, mostarda e sálvia foram menos eficazes, ou não tiveram nenhuma ação.

Óleo essencial de sálvia mostrou-se eficaz contra *Salmonella enteritidis* (HAYOUNI et al., 2008). OE de segurelha combinada com outro método de conservação, como baixa temperatura, embalagem com atmosfera modificada, uso de irradiação, ou uso de altas pressões, pode ser usada para controlar o crescimento de patógenos, e melhorar a qualidade de carne moída de suíno (CARRAMINANA et al., 2008). Óleo essencial de manjerona mostrou-se eficaz contra vários tipos de bactérias quando usado em linguiça fresca (BUSSATTA et al., 2008).

Extratos de cravo, alecrim, casca de cássia, e alcaçuz usados individualmente em carne suína embalada em atmosfera modificada, e em fatias de presunto embaladas a vácuo, mostraram uma grande atividade antimicrobiana. Porém a utilização conjunta de alecrim com alcaçuz mostrou-se mais eficaz contra *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, e *Lactobacillus sake* (ZHANG et al., 2009). Oliveira (2010) utilizando óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) em mortadela, verificou que o mesmo, em concentrações acima de 1,56%



combinado com 100ppm de nitrito de sódio, apresentou efeito inibitório contra o *Clostridium perfringens*.

#### 2.11.13 OE's no controle do *C. botulinum*

Vários estudos foram estabelecidos combinando fatores físicos e/ou químicos dos produtos cárneos com aditivos químicos com objetivo de avaliar sua eficácia contra o *C. botulinum*, porém poucos estudos contemplam a utilização de compostos naturais de plantas (CUI, GABRIEL, NAKANO, 2010).

Ismaiel e Pierson (1990) estudaram a eficácia de OE's de orégano contra esporos de *C. botulinum* em carne moída de suíno. Utilizaram a concentração de 0,4µl/g de óleo essencial de orégano, e verificaram que o mesmo não teve influência significativa no número de esporos, ou no crescimento dos mesmos. Entretanto, quando uma pequena quantidade de nitrito de sódio foi adicionada juntamente com a mesma concentração de óleo essencial de orégano verificou-se uma diminuição do crescimento das bactérias quando comparado somente com a utilização de nitrito. Esta redução foi dependente do número de esporos inoculados, sendo maior para a adição de 300 esporos/g, do que para 3000 esporos/g.

Cui, Gabriel, Nakano (2010) avaliaram a atividade antibotulínica de vários extratos de plantas utilizados isolados ou em combinação com nitrito de sódio. Utilizaram extratos solúveis em etanol ou água, obtidos de 90 tipos de ervas ou especiarias frescas ou desidratadas, em modelo utilizando meio de cultura ágar TPGY, e em modelo utilizando carne. Neste estudo verificaram que o extrato aquoso de cravo, e os extratos alcoólicos de eucalipto limão, maçã, e alcaçuz apresentaram maior atividade antibotulínica em meio ágar TPGY na concentração com CIM variando de 0,05% a 0,2%. Quando se utilizou a combinação dos extratos com nitrito de sódio em meio ágar TPGY somente foi observado efeito sinérgico com extrato aquoso de *Coptis rhizome*<sup>(1)</sup>, reduzindo a CIM de nitrito de 6-8ppm para 2ppm combinado com 0,05% de extrato de *Coptis*. No modelo utilizando carne verificaram ação sinérgica do extrato alcoólico de noz-moscada (0,05%) e sálvia (0,02%), e extrato aquoso de cravo (0,05%), com 10ppm de nitrito, para controle do *C. botulinum*.

<sup>(1)</sup> *Coptis rhizome* é uma espécie de erva nativa da China utilizada na medicina tradicional chinesa.

## 2.12 MORTADELA

### 2.12.1 Definição

Segundo Pardi et al. (1996) entende-se por mortadela o produto de salsicharia de massa emulsionada, normalmente embutido em envoltórios naturais ou artificiais, elaborado à base de carnes bovina e/ou suína, tratado com sais de cura, condimentado, defumado ou não e cozido por lapso de tempo proporcional ao seu volume e natureza. Durante o cozimento o produto deve alcançar pelo menos 71°C internamente.

De acordo com o regulamento técnico de identidade e qualidade de mortadela, entende-se por mortadela o produto cárneo industrializado, obtido de uma emulsão das carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas, e submetido ao tratamento térmico adequado (BRASIL, 2000).

### 2.12.2 Classificação

O produto é classificado de acordo com a composição da matéria-prima utilizada e das técnicas de fabricação utilizadas (BRASIL,2000):

- Mortadela: carnes de diferentes espécies de animais de açougue, carnes mecanicamente separadas, até o limite máximo de 60%, miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue (estômago, coração, língua, fígado, rins, miolos), pele e tendões no limite de 10% (máx.) e gorduras.
- Mortadela tipo Bolonha: carnes bovina e/ou suína, e/ou ovina, e carnes mecanicamente separadas até o limite máximo de 20%, miúdos comestíveis de bovino e/ou suíno e/ou ovino (estômago, coração, língua, fígado, rins, miolos), pele e tendões no limite de 10% (máx.) e gorduras.

- Mortadela Italiana: porções musculares de carnes bovina e/ou suína e toucinho, embutida na forma arredondada, não sendo permitida a adição de amido.
- Mortadela Bolonha: porções musculares de carnes ovina e/ou suína e toucinho, embutida em forma arredondada, não sendo permitida a adição de amido.
- Mortadela de Carne de Aves: carne de ave, carne mecanicamente separada de aves, no máximo de 40%, até 5% de miúdos comestíveis de aves (fígado, moela, coração) e gordura.

### 2.12.3 Composição

Como ingredientes obrigatórios temos: carne das diferentes espécies de animais de açougue e sal. Nas mortadelas “Italiana” e “Bolonha” o toucinho em cubos deverá ser aparente ao corte. Como ingredientes opcionais pode-se utilizar:

- Água;
- Gordura animal e/ou vegetal;
- Proteína animal e/ou vegetal;
- Aditivos intencionais;
- Agentes de liga;
- Açúcares;
- Aromas, especiarias e condimentos;
- Vegetais (amêndoas, pistache, frutas, azeitonas, etc.)
- Queijos.

Nota: permite-se a adição de 4% (máx.) de proteínas não cárnicas (proteína de soja, do leite, ou de colágeno bovino), como proteína agregada. Não será permitida a adição de proteínas não cárnicas nas mortadelas Bolonha e Italiana, exceto as proteínas lácteas (BRASIL, 2000).

A utilização de aditivos e conservantes é regulamentada pela Instrução Normativa N.º 51, de 29 de dezembro de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a qual define os limites máximos de utilização destes produtos (BRASIL, 2007).

#### 2.12.4 Requisitos sensoriais e físico-químicos

Como características sensoriais o produto deve atender:

- Textura; Característica
- Cor: característica
- Sabor: característico
- Odor: característico

Como características físico químicas o produto deve atender:

- Amido (máx.) – 5,0%
- Umidade (máx.) – 65%
- Carboidratos totais (máx.) – 10% - mortadelas Bolonha e Italiana (máx.) 3%
- Gordura (máx.) – 30% - mortadelas Bolonha e Italiana (máx.) 35%
- Proteína (mín.) 12%
- Teor de cálcio (máx.), definido abaixo pela tabela 6.

TABELA 6 - TEOR MÁXIMO DE CÁLCIO EM BASE SECA EM MORTADELAS

PRODUTO	TEOR DE CÁLCIO EM BASE SECA
Mortadela	0,9%
Mortadela de Ave	0,6%
Mortadela tipo Bolonha	0,3%
Mortadela Italiana	0,1%
Mortadela Bolonha	0,1%

FONTE: BRASIL, 2000

A somatória dos açúcares totais (carboidratos totais incluindo os de origem do amido ou da fécula) não deverá ultrapassar o teor de 10%, sendo que o teor máximo de amido se limita a 5% (BRASIL, 2011).

### 2.12.5 Padrões microbiológicos para mortadelas

Os padrões microbiológicos para a mortadela seguem a RDC n.º 12, de 2 de janeiro de 2001, sendo os seguintes parâmetros estabelecidos:

- Coliformes a 45°C – máximo 1000/g
- Estafilococos coagulase positiva – máximo 3000/g
- Clostridium sulfito redutor a 46°C – máximo 500/g
- *Salmonella sp* – ausência em 25g

### 2.12.6 Processo de fabricação de mortadelas

A produção industrial de mortadela inicia-se com a recepção das matérias primas, que podem ser recebidas em forma de cortes, ou em forma de carcaças. Caso sejam recebidas em carcaças as mesmas sofrem o desposteamento em sala de desossa, para obtenção dos cortes utilizados na produção. Após obter-se as carnes as mesmas são pesadas e picadas em um moedor industrial. Em seguida faz-se a mistura e emulsificação do produto em um equipamento denominado *cutter*. Neste processo são adicionados as carnes, os aditivos e os coadjuvantes de tecnologia, os quais são misturados e emulsionados. Caso utilize-se toucinho em cubos e pimenta em grãos, deve-se realizar a mistura dos mesmos em uma misturadeira industrial. Posteriormente realiza-se o embutimento em envoltório natural ou artificial, e realiza-se o cozimento. O processo de cozimento é realizado em estufas com temperatura de aproximadamente 80°C, até que se atinja no centro térmico do produto 72°C. Terminado o cozimento o produto sofre um resfriamento rápido em água fria, e em seguida um resfriamento sob refrigeração até atingir +4°C internamente. Seguidamente o produto é embalado, rotulado e armazenado em câmaras de resfriamento e posteriormente expedido (LIDON e SILVESTRE, 2007).

A figura 8 apresenta um fluxograma básico de produção industrial de mortadela.

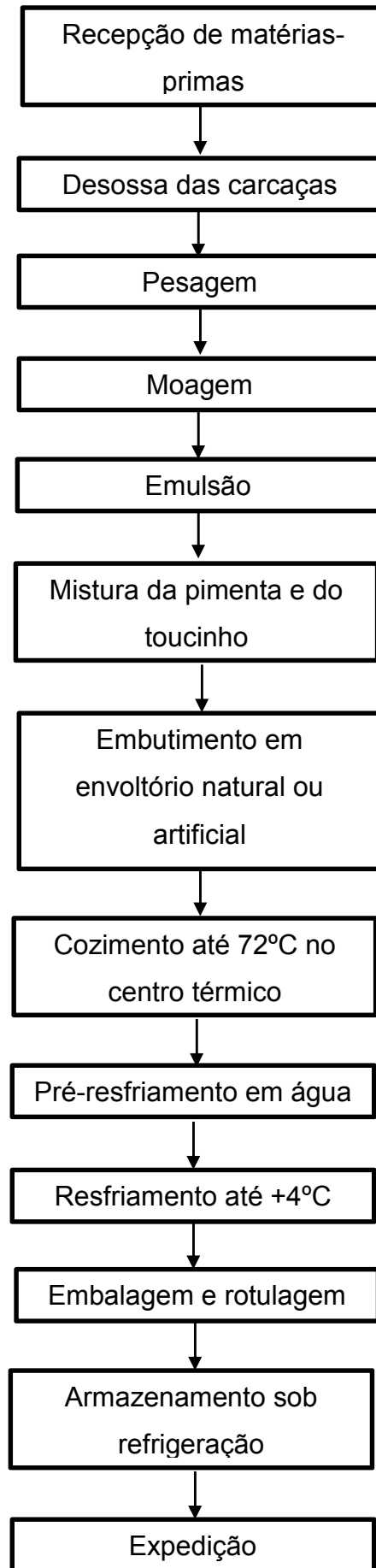


FIGURA 8 - FLUXOGRAMA BÁSICO DE PRODUÇÃO DE MORTADELA  
FONTE: LIDON E SILVESTRE (2007)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CULTURA MICROBIANA E PREPARO DO INOCULO

Utilizou-se a cepa de *Clostridium sporogenes* ATCC® 11437™, INCQS 00060 (American Type Culture Collection – EUA), fornecida pela Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ).

A cepa liofilizada foi reativada em Meio Tioglicolato (Laborclin®), suplementado com 0,5% de solução filtrada de sulfato de sódio (4%), sendo em seguida colocada em jarra de anaerobiose de 2,5 litros. Em seguida adicionou-se um gerador e um indicador de anaerobiose (Anaerobac, marca Probac®) na jarra e a incubou durante 48 horas a 37°C em estufa (marca Sterilifer, modelo 1.2.DTMC). Após a reativação a cultura foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 min sendo o sobrenadante descartado. O sedimento foi então resuspendido em 10mL de água peptonada estéril, e foi novamente centrifugado, descartando-se novamente o sobrenadante. Em seguida diluiu-se o sedimento em 10mL de água peptonada estéril, e utilizou-se imediatamente esta solução para produção dos esporos.

Para produção dos endosporos transferiu-se 1mL da solução acima para tubos contendo 4mL do Caldo BHI (Brian Heart Infusion, Laborclin®), e incubou-se em jarra de anaerobiose a 33°C durante 72 horas (jarra equipada com gerador e indicador de anaerobiose incubada em estufa com temperatura controlada). Após o período de incubação verificou-se a produção dos esporos, utilizando-se a técnica oficial do Ministério da Agricultura conforme IN Nº 62 da SDA de 26/08/2003 (técnica de Wirtz-Conklin) (BRASIL,2003). Neste procedimento realizou-se o esfregaço utilizando-se uma gota do Caldo BHI onde foi inoculada a cepa; recobriu-se a lâmina com corante verde de malaquita (5% m/v), e contracorante de safranina (0,5% m/v). Visualizou-se em microscópio com objetiva de imersão a presença dos esporos (microscópio marca Micronal modelo Olympus). Confirmada a presença dos esporos realizou-se o procedimento de centrifugação e lavagem conforme descrito acima.

Confirmada a presença de esporos na suspensão aqueceu-se a mesma em água a temperatura de 80°C durante 15 min, e resfriou-se rapidamente inativando-se as células viáveis. Realizou-se então diluições seriadas em água peptonada estéril,

utilizando 1mL da suspensão de esporos com 9mL de água peptonada, repetindo o mesmo procedimento para as outras seis diluições seriadas. Em seguida realizou-se o plaqueamento em meio de cultura BHI agar (Brian Heart Infusion, Laborclin®), utilizando 0,1mL de cada suspensão (diluições  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ ) com as placas incubadas a 37°C durante 48 horas anaerobicamente. As placas foram incubadas em triplicata, sendo as colônias contadas após o término do tempo de incubação, e realizada a média aritmética dos valores encontrados. O restante da suspensão com esporos foi mantido sob refrigeração de +4°C até o término da contagem das células viáveis originadas dos esporos. Após a contagem das colônias realizou-se a padronização em  $2,0 \times 10^5$  a  $5,0 \times 10^5$  esporos por mL diluindo-se a suspensão com os esporos em água peptonada estéril 0,1% p/v, sendo a mesma armazenada a +4°C, até ser utilizada no dia seguinte.

### 3.2 PRODUÇÃO DA MORTADELA

As amostras de mortadela foram produzidas na empresa Frigorífico Juliatto em São José dos Pinhais, estado do Paraná. Também as matérias-primas e os aditivos foram cedidos pela empresa acima citada. Os óleos essenciais foram cedidos pela empresa Bremil® de Arroio do Meio, Rio Grande do Sul. O extrato de orégano em forma de pó foi cedido pela empresa Fego® Alimentos de Goiana, Goiás. A composição dos óleos essenciais encontra-se na seção de anexos, juntamente com as demais fichas técnicas dos produtos utilizados na produção da mortadela.

A formulação utilizada foi baseada no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Mortadela (BRASIL, 2000), e também para obter-se atividade de água acima de 0,94, e simular um produto de custo mediano ao consumidor no mercado brasileiro.



### 3.2.1 Formulações utilizadas e delineamento experimental

Na Tabela 7 pode ser visualizada a formulação de controle para produção da mortadela de carne suína e de aves:

TABELA 7 - FORMULAÇÃO DE CONTROLE DA MORTADELA TESTADA

INGREDIENTES	(%)
Recortes de carne suína	30,00
Carne mecanicamente separada de aves	28,00
Papada de suíno	18,00
Água/gelo	8,00
Toucinho	5,00
Fécula de mandioca	4,00
Sal (NaCl)	2,20
Proteína isolada de soja (Solei)	2,00
Maltodextrina	2,00
Tripolifosfato de sódio (Bremil)	0,40
Glutamato monossódico	0,20
Eritorbato de sódio	0,10
Corante carmim cochonilha (Fuchs)	0,10
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

FONTE: O autor (2015)

Tomando como base a formulação controle (tabela 7), as novas formulações foram acrescidas de nitrito de sódio, lactato de sódio, e óleos essenciais ou extratos vegetais. Para a realização dos experimentos empregou-se a metodologia do Planejamento Fatorial Cruzado completo onde foram avaliados 3 fatores (variáveis), com os seguintes níveis:

- Fator 1 ( $X_1$ ): nitrito de sódio com dois níveis, 60ppm e 120ppm de adição.
- Fator 2 ( $X_2$ ): lactato de sódio com dois níveis, 0% e 1,2% de adição.
- Fator 3 ( $X_3$ ): utilização dos produtos naturais com 6 níveis, sem adição, com adição de 0,20% de extrato de orégano (EXOR), 0,20% de OE's de coentro (OEEO), 0,17% de OE's de cravo (OEER), 0,20% de OE's de alecrim (OEAL), e 0,20% de OE's de noz-moscada (OENM).

A tabela 8 mostra um resumo das variáveis independentes estudadas e seus níveis.

TABELA 8 - VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS ESTUDADOS

Variáveis	Variáveis codificadas	Níveis					
		1	2	3	4	5	6
Nitrito de sódio	X1	60ppm	120ppm	-	-	-	-
Lactato de sódio	X2	0%	1,2%	-	-	-	-
Conservantes naturais	X3	Sem adição	0,20% EXOR	0,20% OEEO	0,17% OEER	0,20% OEAL	0,20% OENM

FONTE: O autor (2015)

Realizou-se então um planejamento fatorial completo 2x2x6 totalizando 24 experimentos (RIBEIRO e TEM CATEN, 2011), também realizou-se 4 experimentos sem a adição de nenhum tipo de conservante para obter os dados no ponto zero. A tabela 9 apresenta as condições dos experimentos com os valores reais e codificados dos experimentos. As concentrações dos OE's e extratos naturais utilizados basearam-se nos resultados obtidos por Cui, Gabriel e Nakano (2010), que determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) "*in vitro*" de OE's e extratos naturais contra *Clostridium spp* em meio de cultura TPGY. As concentrações utilizadas foram de apenas 40% dos valores encontrados pelos autores em seus estudos "*in vitro*".

Como resposta do experimento determinou-se se ocorreu ou não a germinação dos esporos de *Clostridium sporogenes* diariamente durante os 60 dias de estocagem, pela verificação visual de estufamento das embalagens, e confirmação posterior da presença das células vegetativas.

TABELA 9 - MATRIZ DOS EXPERIMENTOS COM VALORES CODIFICADOS E REAIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2X2X6

<b>Experimento n.º</b>	<b>(X1) NaNO<sub>2</sub> %(p/p)</b>	<b>(X2) Lactato de sódio %(p/p)</b>	<b>(X3) Conservante natural %(p/p)</b>
<b>0/1*</b>	0 (0ppm)	1 (0%)	1 (SA)
<b>0/2*</b>	0 (0ppm)	1 (0%)	1 (SA)
<b>0/3*</b>	0 (0ppm)	1 (0%)	1 (SA)
<b>0/4*</b>	0 (0ppm)	1 (0%)	1 (SA)
<b>1</b>	1 (60ppm)	1 (0%)	1 (SA)
<b>2</b>	1 (60ppm)	1 (0%)	2 (0,20% EXOR)
<b>3</b>	1 (60ppm)	1 (0%)	3 (0,20% OEEO)
<b>4</b>	1 (60ppm)	1 (0%)	4 ( 0,17% OEER)
<b>5</b>	1 (60ppm)	1 (0%)	5 (0,20% OEAL)
<b>6</b>	1 (60ppm)	1 (0%)	6 (0,20% OENM)
<b>7</b>	1 (60ppm)	2 (1,2%)	1 (SA)
<b>8</b>	1 (60ppm)	2 (1,2%)	2 (0,20% EXOR)
<b>9</b>	1 (60ppm)	2 (1,2%)	3 (0,20% OEEO)
<b>10</b>	1 (60ppm)	2 (1,2%)	4 ( 0,17% OEER)
<b>11</b>	1 (60ppm)	2 (1,2%)	5 (0,20% OEAL)
<b>12</b>	1 (60ppm)	2 (1,2%)	6 (0,20% OENM)
<b>13</b>	2 (120ppm)	1 (0%)	1 (SA)
<b>14</b>	2 (120ppm)	1 (0%)	2 (0,20% EXOR)
<b>15</b>	2 (120ppm)	1 (0%)	3 (0,20% OEEO)
<b>16</b>	2 (120ppm)	1 (0%)	4 ( 0,17% OEER)
<b>17</b>	2 (120ppm)	1 (0%)	5 (0,20% OEAL)
<b>18</b>	2 (120ppm)	1 (0%)	6 (0,20% OENM)
<b>19</b>	2 (120ppm)	2 (1,2%)	1 (SA)
<b>20</b>	2 (120ppm)	2 (1,2%)	2 (0,20% EXOR)
<b>21</b>	2 (120ppm)	2 (1,2%)	3 (0,20% OEEO)
<b>22</b>	2 (120ppm)	2 (1,2%)	4 ( 0,17% OEER)
<b>23</b>	2 (120ppm)	2 (1,2%)	5 (0,20% OEAL)
<b>24</b>	2 (120ppm)	2 (1,2%)	6 (0,20% OENM)

FONTE: O autor (2015)

NOTA: \* Experimentos de 0/1 a 0/4 utilizados para determinação do ponto zero.

Para a realização dos experimentos acima aleatorizou-se a ordem dos mesmos, e também observou-se a mesma sistemática dos ensaios, mesmas máquinas, mesma matéria prima, etc.

### 3.2.2 Processo de fabricação da mortadela

No processo de produção da mortadela, inicialmente foram pesados os recortes de suíno, a carne mecanicamente separada de aves, a papada de suíno, o toucinho de suíno, e 70% do total de gelo, para uma batelada de 548,4kg (utilizou-se uma balança marca Digitron®, modelo Universal-Line, cap. 200kg, e=d=50g, previamente aferida). Em seguida estes itens foram moídos em disco com 12mm de diâmetro (utilizou-se um moedor marca Incomaf®, modelo TR160). Posteriormente foram pesados 50% da proteína de soja, 50% do sal, a maltodextrina, o glutamato monossódico, o tripolifosfato de sódio, e o corante carmim de cochonilha, para uma batelada de 548,4kg (utilizou-se uma balança marca Toledo, modelo 2096 H/4, cap. 25kg, e=d=0,005kg, previamente aferida). Seguidamente todas as matérias primas e os ingredientes já pesados foram colocados em um misturador (marca Incomaf®, modelo 750), deixando-se misturar por 5 min.

Após feita a mistura dividiu-se a massa em 28 partes iguais de 19,60 kg cada, que correspondem aos 28 experimentos. Pesou-se então a proteína de soja faltante para cada teste (1% - 214g), a fécula de mandioca para cada teste (4% - 857g), o sal faltante para cada teste (1,1% - 236g), o eritorbato de sódio de cada teste (0,1%, - 21,4g), a água faltante para cada teste (2,4% - 514g, para formulação com lactato de sódio apenas 342g), o lactato de sódio (1,2% - 429g do produto Purasal, marca Purac®, que possui 60% de lactato de sódio), o nitrito de sódio de cada formulação (0,006% - 1,28g ou 0,012% - 2,57g), e as quantidades correspondentes dos antimicrobianos naturais conforme cada formulação (0,20% - 45g, 0,17% - 38g). Para estas pesagens utilizou-se uma balança marca Marte, modelo AS 5500C, cap. máx. 5kg, e=d=0,01g, previamente aferida. Na tabela 10 são apresentadas as porcentagens das matérias-primas e aditivos utilizados em cada formulação testada. Antes de fazer a emulsificação da massa misturou-se o eritorbato de sódio com o restante da água de cada formulação, e misturou-se o sal com o nitrito de sódio, com a proteína de soja, e com o conservante natural conforme cada formulação. Esta mistura foi mantida fechada em um pacote com alta barreira para evitar a perda dos compostos voláteis dos compostos naturais. Seguidamente realizou-se a emulsificação de cada teste no *cutter* (marca Ibrasmak®, modelo 200 litros). Para isto adicionou-se no *cutter* os 19,60kg da pré-mistura, a mistura de sal, o lactato de sódio, e a fécula de mandioca,

e no final da emulsificação o eritorbato com o restante da água, o tempo total de emulsificação e refino da massa foi de aproximadamente 2 minutos. Repetiu-se este mesmo procedimento para os demais testes, sempre procedendo a lavagem do *cutter* entre cada batelada.

Após o preparo das massas, embutiu-se imediatamente as mesmas em tripas artificiais de poliamida calibre 40mm (Linha MAX M, marca Descartável Embalagens®, filme coextrusado e biorientado em 5 camadas à base de poliamida, com permeabilidade ao  $O_2 < 30 \text{ cm}^3/\text{m}^2.\text{dia}$ ) com peso de aproximadamente 120g por peça, grampeando-se as extremidades das peças. Foram embutidas 30 peças de cada teste, utilizando-se uma embutideira marca Jamar® modelo 8 litros. Este procedimento foi repetido para os demais testes, sempre procedendo a lavagem do equipamento entre o embutimento de cada teste. Foram separadas 5 amostras de cada teste aleatoriamente, e mais 20 amostras dos testes 1,7,13, e 19 para acompanhamento do nitrito residual durante a vida de prateleira do produto. Após este processo as amostras foram imediatamente transportadas sob refrigeração para o laboratório de microbiologia da UFPR.

TABELA 10 - PORCENTAGEM DE MATÉRIAS-PRIMAS E ADITIVOS UTILIZADOS EM CADA FORMULAÇÃO DE MORTADELA TESTADA (CONTINUA)

INGREDIENTES/ FORMULAÇÃO	% PRODUTO FINAL												
	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F12	F12
Recortes de carne suína	30,000	29,998	29,938	29,938	29,947	29,938	29,938	29,673	29,577	29,577	29,586	29,577	29,577
CMS	28,000	27,998	27,942	27,942	27,951	27,942	27,942	27,661	27,606	27,606	27,614	27,606	27,606
Papada de suíno	18,000	17,999	17,963	17,963	17,968	17,963	17,963	17,782	17,746	17,746	17,752	17,746	17,746
Água/gelo	8,000	8,000	7,984	7,984	7,986	7,984	7,984	7,903	7,887	7,887	7,890	7,887	7,887
Toucinho	5,000	5,000	4,990	4,990	4,991	4,990	4,990	4,939	4,930	4,930	4,931	4,930	4,930
Fécula de mandioca	4,000	4,000	3,992	3,992	3,993	3,992	3,992	3,952	3,944	3,944	3,945	3,944	3,944
Sal (NaCl)	2,200	2,200	2,195	2,195	2,196	2,195	2,195	2,173	2,169	2,169	2,170	2,169	2,169
Proteína de soja	2,000	2,000	1,996	1,996	1,996	1,996	1,996	1,976	1,972	1,972	1,972	1,972	1,972
Maltodextrina	2,000	2,000	1,996	1,996	1,996	1,996	1,996	1,976	1,972	1,972	1,972	1,972	1,972
Tripolifosfato de sódio	0,400	0,400	0,399	0,399	0,399	0,399	0,399	0,395	0,394	0,394	0,394	0,394	0,394
Glutamato monossódico	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,198	0,197	0,197	0,197	0,197	0,197
Eritorbato de sódio	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,099	0,099	0,099	0,099	0,099	0,099
Corante carmim(3%)	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,099	0,099	0,099	0,099	0,099	0,099
Nitrito de sódio	0,000	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Lactato de sódio	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,205	1,203	1,203	1,203	1,203	1,203
Extrato de orégano	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,200	0,200
ÓE de coentro	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000
OE de cravo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,170	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,170	0,000	0,000
OE de alecrim	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000
OE de noz-moscada	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200
<b>TOTAL</b>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

FONTE: O autor (2015)

TABELA 10 - PORCENTAGEM DE MATÉRIAS-PRIMAS E ADITIVOS UTILIZADOS EM CADA FORMULAÇÃO DE MORTADELA TESTADA (CONCLUSÃO)

INGREDIENTES/ FORMULAÇÃO	% PRODUTO FINAL											
	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24
Recortes de carne suína	29,996	29,937	29,937	29,945	29,937	29,937	29,635	29,576	29,576	29,585	29,576	29,576
CMS	27,997	27,941	27,941	27,949	27,941	27,941	27,659	27,605	27,605	27,613	27,605	27,605
Papada de suíno	17,998	17,962	17,962	17,967	17,962	17,962	17,781	17,746	17,746	17,751	17,746	17,746
Água/gelo	7,999	7,983	7,983	7,985	7,983	7,983	7,903	7,887	7,887	7,889	7,887	7,887
Toucinho	4,999	4,989	4,989	4,991	4,989	4,989	4,939	4,929	4,929	4,931	4,929	4,929
Fécula de mandioca	4,000	3,992	3,992	3,993	3,992	3,992	3,951	3,944	3,944	3,945	3,944	3,944
Sal (NaCl)	2,200	2,195	2,195	2,196	2,195	2,195	2,173	2,169	2,169	2,170	2,169	2,169
Proteína de soja	2,000	1,996	1,996	1,996	1,996	1,996	1,976	1,972	1,972	1,972	1,972	1,972
Maltodextrina	2,000	1,996	1,996	1,996	1,996	1,996	1,976	1,972	1,972	1,972	1,972	1,972
Tripolifosfato de sódio	0,400	0,399	0,399	0,399	0,399	0,399	0,395	0,394	0,394	0,394	0,394	0,394
Glutamato monossódico	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,198	0,197	0,197	0,197	0,197	0,197
Eritorbato de sódio	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,099	0,099	0,099	0,099	0,099	0,099
Corante carmim(3%)	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,099	0,099	0,099	0,099	0,099	0,099
Nitrito de sódio	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
Lactato de sódio	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,205	1,203	1,203	1,203	1,203	1,203
Extrato de orégano	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,200	0,200
ÓE de coentro	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000
OE de cravo	0,000	0,000	0,000	0,170	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,170	0,000	0,000
OE de alecrim	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000
OE de noz-moscada	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200
<b>TOTAL</b>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

FONTE: O autor (2015)

### 3.2.3 Inoculação dos esporos

Para inoculação dos esporos foram seguidos os procedimentos descritos por Junqueira, Serrano, Manhani (1997). Para cada teste utilizou-se 5 amostras de cada tratamento, as quais foram injetadas individualmente com 0,5mL da suspensão de esporos de *C. sporogenes* contendo em  $2,0 \times 10^5$  a  $5,0 \times 10^5$  esporos por mL. Para tal procedimento utilizou-se uma seringa de 1ml com uma agulha de 5cm de comprimento, sendo o volume distribuído no interior da peça no sentido longitudinal. Este procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Com a inoculação acima, o produto ficou com 1200 a 3000 esporos/g. Após a inoculação dos esporos as mortadelas foram embaladas individualmente a vácuo em embalagens termo encolhíveis (Sacos Barrier Bag BB494, marca Cryovac®, com estrutura EVA multicamadas com alta barreira ao oxigênio – impermeável ao O<sub>2</sub> máx. 30 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>.dia). Para tal procedimento utilizou-se uma embaladora marca Inauen Maschinen, modelo CH - 9100.

### 3.2.4 Cozimento do produto

Após a embalagem realizou-se o cozimento do produto em água obedecendo-se a seguinte sequência:

1. 15 minutos em temperatura de 60°C
2. 15 minutos em temperatura de 65°C
3. 15 minutos em temperatura de 75°C
4. 15 minutos em temperatura de 85°C (até o produto atingir 78°C internamente em seu ponto central)

Terminado o cozimento resfriou-se o produto em água gelada até a temperatura interna atingir +20°C.



### 3.2.5 Estocagem das mortadelas

Após o resfriamento as peças de mortadela foram incubadas em estufa com temperatura de  $+28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 60 dias. A temperatura da estufa foi aferida utilizando um termômetro marca AKSO®, modelo AK30, (resolução  $0,1^{\circ}\text{C}$ , exatidão  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Durante o tempo de armazenamento do produto a temperatura da estufa foi monitorada diariamente através de um Termo Higrômetro marca J. Prolab®.

### 3.2.6 Análises físico-químicas

Realizaram-se determinações de pH em triplicata, em todas as formulações após o resfriamento do produto, para verificar a existência de diferença significativa de pH entre as formulações, o que poderia influenciar na germinação dos esporos, caso o valor estivesse fora da faixa entre 6,0 a 6,5. Para estas análises utilizou-se um pHmetro marca Hanna® modelo HI99163N, com eletrodo de pH FC232D (resolução do equipamento 0,01 e precisão a  $+20^{\circ}\text{C} \pm 0,02$ ). Antes de realizar cada medida o pHmetro foi calibrado usando um conjunto de soluções padrão de pH 4,01/7,01/10,01, conforme determina manual do fabricante. As análises de pH seguiram a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).

Realizaram-se determinações da atividade de água ( $a_w$ ) em todas as formulações após o resfriamento da mortadela, para verificar se ocorreu diferença significativa entre as formulações testadas para este parâmetro, o qual iria influenciar na germinação das cepas inoculadas, caso o seu valor não estivesse acima de 0,94. Para esta determinação utilizou-se um medidor de atividade de água marca Novasina, modelo LabSwift (exatidão 0,01  $a_w$ , resolução 0,001  $a_w$ , trabalhando em temperatura entre 15 a  $30^{\circ}\text{C}$ ). Antes das medições o equipamento foi calibrado com os sais padrões com 0,576  $a_w$ , 0,753  $a_w$ , 0,843  $a_w$ , e 0,901  $a_w$ , conforme determina manual do fabricante. As análises de  $a_w$  foram realizadas conforme método oficial de análise número 978.18 da AOAC (AOAC, 2005).

Realizou-se o acompanhamento do nitrito residual das formulações 1, 7, 13, e 19 durante todo o período de armazenamento do produto. Foram utilizadas estas formulações pois as mesmas combinaram os dois níveis de nitrito de sódio (60ppm e 120ppm) com os dois níveis de lactato de sódio (sem adição e com adição de 1,20%) sem a adição de conservantes naturais. Realizou-se análises logo após o resfriamento da mortadela, e a cada três dias durante os 60 dias de armazenamento. Para realização destes testes utilizou-se o método oficial preconizado pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 1999).

O princípio do método baseia-se na reação de diazotação de nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. O produto resultante foi determinado espectrofotometricamente a 540nm (BRASIL, 1999).

Para o cálculo do nitrito residual utilizou-se:

$$\text{mg/mL de nitrito de sódio} = A \times 25 \times F \times P^{-1}$$

Onde:

A = absorbância da amostra

F = fator da curva de nitrito de sódio

P = massa da amostra em gramas

### 3.2.7 Acompanhamento da germinação de esporos

Avaliou-se as amostras de mortadela inoculadas com esporos estocadas a 28°C diariamente durante os 60 dias de armazenamento. Nesta avaliação observou-se a produção ou não de gás nas embalagens. Quando se observou estufamento da embalagem, abriu-se a mesma, e verificou-se a formação do odor butírico característico das cepas utilizadas. Em caso positivo coletou-se uma parte da área central do produto, triturou-se a mesma e diluiu-se em água peptonada estéril. A seguir esta solução foi homogeneizada em stomacher (marca Stomax, modelo ST400) durante 2 min. Em seguida filtrou-se a amostra, e repetiu-se o procedimento acima novamente. Em seguida confirmou-se a presença de células vegetativas de

*Clostridium sporogenes* utilizando-se a técnica de Wirtz-Conklin, já descrita anteriormente.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os valores obtidos de pH e  $a_w$  foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância *three-way* (ANOVA), onde o teste F ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) indicou se ocorreram diferenças significativas nestes parâmetros entre as formulações testadas. Primeiramente foram checadas as três suposições da ANOVA para que os resultados sejam validos.

- Suposição 1: observações são independentes
- Suposição 2: homogeneidade nas variâncias - utilizou-se o teste de Levene, o qual indica variâncias semelhantes quando o valor de p for maior que 0,05.
- Suposição 3: dados seguem uma distribuição normal – utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk, o qual comprova a normalidade dos dados quando o valor-p encontrado for de acima de 0,05.

Os dados obtidos no experimento para germinação dos esporos foram tratados estatisticamente para verificar se ocorreram interações entre os fatores testados. Como a variável resposta é uma contagem no tempo (dias), optou-se em usar o modelo linear generalizado com a resposta modelada por uma distribuição de Poisson. Para esta distribuição a função ligação natural é o log, fato pelo qual o modelo é conhecido como log-linear. Neste caso não se aplica ANOVA, pois, os dados não seguem uma distribuição normal e a variável resposta é uma série temporal discreta.

Primeiramente testou-se o modelo para verificar se o mesmo seria significativo. Para isto utilizou-se os testes de Deviance e Qui-quadrado de Pearson. Em ambos os testes a hipótese nula é que indica que o modelo é significativo, ou seja, se a estatística  $p > 0,05$ , implica que devemos aceitar a hipótese nula. Após a confirmação do modelo realizou-se o teste de significância de cada fator e suas interações, utilizando o teste de Qui-quadrado de Wald, o qual irá mostrar a significância de cada fator e também de suas interações, sendo que, valores de

$p < 0,05$  indica que o fator ou sua interação foi significativo. Confirmada interações significativas entre os fatores, realizou-se os testes para verificar quais interações de segunda ou terceira ordem foram significativas. Para isto aplicou-se o teste da estatística de Wald considerando um nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

Para tratamento dos dados utilizou-se o software IBM SPSS Statistics versão 19.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS DO pH E ATIVIDADE DE ÁGUA

Os resultados obtidos das determinações de pH e atividade de água para as formulações de mortadelas testadas nos experimentos encontram-se na tabela 11.

TABELA 11 - RESULTADO DAS DETERMINAÇÕES DE pH E ATIVIDADE DE ÁGUA PARA CADA FORMULAÇÃO DE MORTADELA TESTADA, REALIZADAS LOGO APÓS O TÉRMINO DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO

Formulação	0/1	0/2	0/3	0/4	1	2	3	4	5	6	17	18	19	20
<b>pH</b>	<b>6,63</b> (±0,02)	<b>6,60</b> (±0,01)	<b>6,62</b> (±0,01)	<b>6,60</b> (±0,02)	<b>6,63</b> (±0,01)	<b>6,63</b> (±0,03)	<b>6,60</b> (±0,01)	<b>6,60</b> (±0,01)	<b>6,64</b> (±0,02)	<b>6,68</b> (±0,03)	<b>6,55</b> (±0,03)	<b>6,62</b> (±0,02)	<b>6,65</b> (±0,02)	<b>6,63</b> (±0,02)
<b>aw</b>	<b>0,952</b> (±0,001)	<b>0,953</b> (±0,001)	<b>0,955</b> (±0,002)	<b>0,956</b> (±0,001)	<b>0,955</b> (±0,002)	<b>0,950</b> (±0,002)	<b>0,953</b> (±0,002)	<b>0,954</b> (±0,002)	<b>0,953</b> (±0,002)	<b>0,949</b> (±0,001)	<b>0,953</b> (±0,001)	<b>0,953</b> (±0,001)	<b>0,948</b> (±0,002)	<b>0,947</b> (±0,002)
Formulação	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	21	22	23	24
<b>pH</b>	<b>6,65</b> (±0,01)	<b>6,67</b> (±0,02)	<b>6,67</b> (±0,02)	<b>6,61</b> (±0,01)	<b>6,62</b> (±0,03)	<b>6,62</b> (±0,02)	<b>6,66</b> (±0,01)	<b>6,61</b> (±0,01)	<b>6,61</b> (±0,02)	<b>6,59</b> (±0,03)	<b>6,68</b> (±0,02)	<b>6,66</b> (±0,02)	<b>6,67</b> (±0,01)	<b>6,63</b> (±0,02)
<b>aw</b>	<b>0,949</b> (±0,001)	<b>0,945</b> (±0,001)	<b>0,948</b> (±0,001)	<b>0,945</b> (±0,001)	<b>0,947</b> (±0,002)	<b>0,947</b> (±0,001)	<b>0,955</b> (±0,001)	<b>0,948</b> (±0,001)	<b>0,951</b> (±0,001)	<b>0,953</b> (±0,001)	<b>0,948</b> (±0,001)	<b>0,948</b> (±0,001)	<b>0,946</b> (±0,001)	<b>0,945</b> (±0,001)

FONTE: O autor (2015)

NOTA: FORMULAÇÕES: 0/1 a 0/4 = controle (0% NaNO<sub>2</sub>, 0% LS, e SCN); 1 a 6 = 60ppm de NaNO<sub>2</sub>, 0% de LS e CN; 7 a 12 = 60ppm de NaNO<sub>2</sub>, 1,20% de LS e CN; 13 a 18 = 120ppm de NaNO<sub>2</sub>, 0% de LS e CN; 19 a 24 = 120ppm de NaNO<sub>2</sub>, 1,20% de LS e CN.

CN: 1, 7, 13 e 19 SCN; 2, 8, 14 e 20 = 0,20% EXOR; 3, 9, 15 e 21 = 0,20% OEEO; 4, 10, 16 e 22 = 0,17% OEER; 5, 11, 17 e 23 = 0,20% OEAL; 6, 12, 18 e 24 = 0,20% OENM.

Resultado das médias aritméticas de três determinações de cada amostra.

Analisando-se a tabela 11 observa-se que o componente que mais influenciou no pH e atividade de água foi o lactato de sódio quando adicionado.

Na tabela 12 temos a média aritmética de todas as análises de pH e atividade de água realizadas. As análises de cada formulação foram agrupadas em um único grupo para cada parâmetro.

TABELA 12 - RESULTADO MÉDIO DE TODAS AS DETERMINAÇÕES DE pH E ATIVIDADE DE ÁGUA, PARA TODAS AS AMOSTRAS DE MORTADELA TESTADAS

Parâmetro	N.º total amostras	Média	Valor mínimo	Valor máximo	Desvios padrão
pH	84	6,63	6,53	6,70	±0,033
aw	84	0,950	0,944	0,957	±0,0034

FONTE: O autor (2015)

Os resultados obtidos de pH foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância *three-way* ANOVA. Primeiramente foram checadas as três suposições da ANOVA, as quais foram confirmadas. Após checadas as suposições aplicou-se então a análise de variância *three-way* nos dados de pH obtidos nas formulações de mortadela que foram testadas, sendo o resumo dos resultados da análise apresentados na tabela 13.

TABELA 13 - RESUMO DO RESULTADO DA ANOVA APLICADA AOS DADOS DE pH OBTIDOS NAS FORMULAÇÕES DE MORTADELA TESTADAS

Conservantes e suas interações	Valor p
Nitrito	0,001
Lactato	0,000
Conservantes naturais	0,012
Nitrito*Lactato	0,000
Nitrito*Conservantes naturais	0,003
Lactato*Conservantes naturais	0,000
Nitrito*Lactato* Conservantes naturais	0,000

FONTE: O autor (2015)

Na tabela 13 verifica-se que existiu diferenças significativas ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ) quando se avaliou os componentes isoladamente, e também em suas interações. A maior variação ocorreu quando foi adicionado o lactato de sódio, como pode ser comprovado na figura 9.

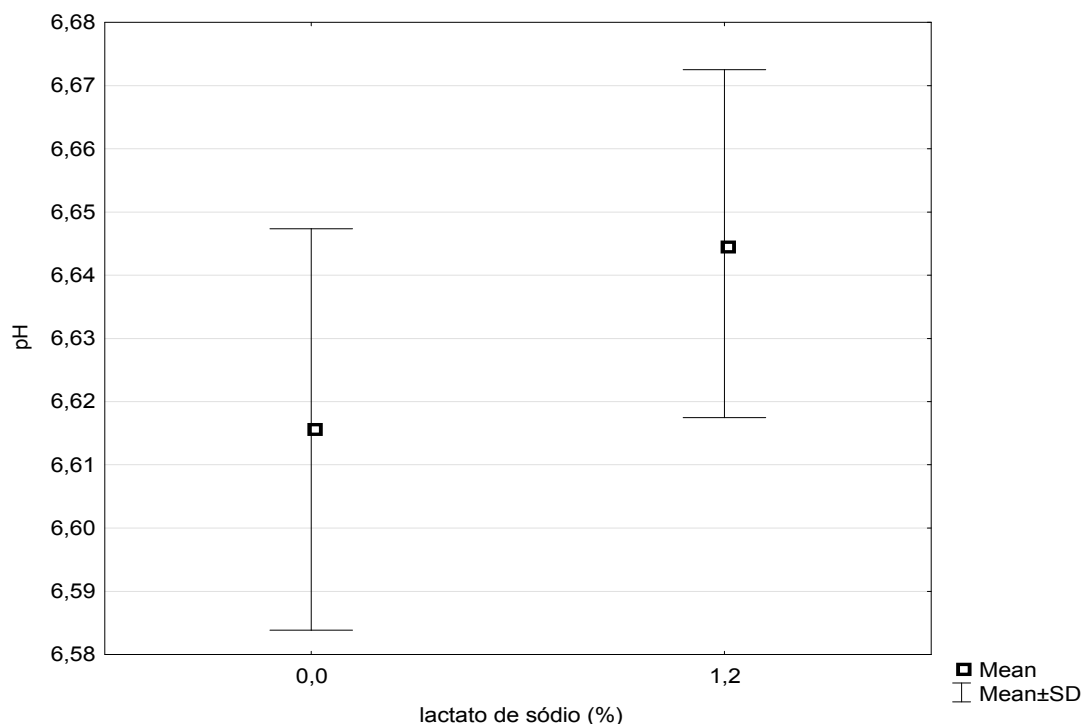


FIGURA 09 - INFLUÊNCIA DO LACTATO DE SÓDIO NO pH DAS FORMULAÇÕES DE MORTADELA TESTADAS  
 FONTE: O autor (2015)

Apesar de ocorrer variação para o pH entre as formulações, a mesma em termos absolutos foi pequena como mostra a tabela 12. Os valores de pH variaram entre 6,55 a 6,70, sendo os desvios padrão da média de todas as determinações de pH igual a 0,033. Segundo Dodds e Austin (2001) um pH acima de 5,0 é suficiente para crescimento de todas as cepas de *Clostridium*. Robison, Gibson, Roberts (1982) verificaram que o melhor crescimento do *C. botulinum* ocorreu na faixa de pH entre 6,30 a 6,70, quando cepas de *C. botulinum* foram incubadas em salsichas. Os dados obtidos para o pH indicam que os mesmos não influenciaram na germinação dos esporos durante o período de incubação, apesar de terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores ao nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos de *aw* foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância *three-way* ANOVA. Primeiramente foram checadas as três suposições da ANOVA, as quais foram confirmadas. Após checadas as suposições aplicou-se então a análise de variância *three-way* nos dados de *aw* obtidos nas

formulações de mortadela que foram testadas, sendo o resumo dos resultados da análise apresentados na tabela 14.

TABELA 14 - RESUMO DO RESULTADO DA ANOVA APLICADA AOS DADOS DE  $a_w$  OBTIDOS NAS FORMULAÇÕES DE MORTADELA TESTADAS

<b>Conservantes e suas interações</b>	<b>Valor p</b>
Nitrito	0,348
Lactato	0,000
Conservantes naturais	0,000
Nitrito*Lactato	0,932
Nitrito*Conservantes naturais	0,679
Lactato*Conservantes naturais	0,008
Nitrito*Lactato* Conservantes naturais	0,000

FONTE: O autor (2015)

Observando a tabela 12 verifica-se que os valores de  $a_w$  tiveram uma variação entre 0,944 a 0,957 com desvios padrão da média de todas as determinações de  $a_w$  igual a 0,0034, sendo a média de 0,950 considerando-se todos os valores analisados (três análises para cada formulação). Na tabela 14 verifica-se que existiu diferenças significativas ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ) quando se avaliou o componente isoladamente, e também em suas interações. Ocorreram diferenças significativas quando foi utilizado o lactato e também os conservantes naturais. As figuras 10 e 11 mostram as variações da  $a_w$  quando adicionados o lactato de sódio e os conservantes naturais respectivamente.



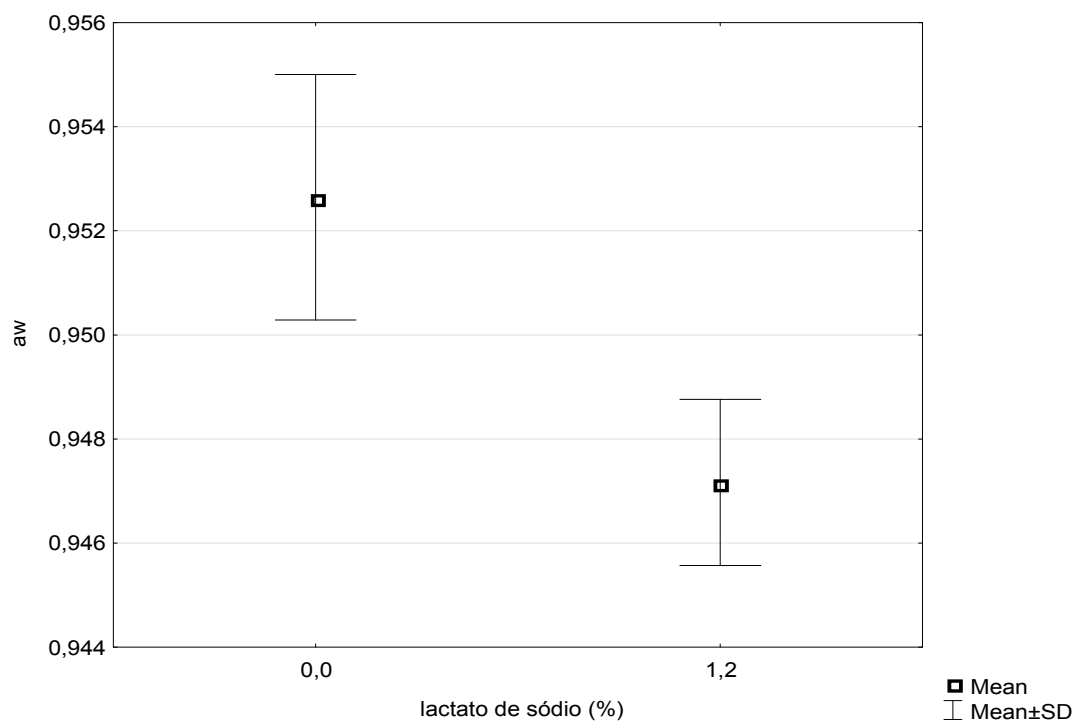


FIGURA 10 - INFLUÊNCIA DO LACTATO DE SÓDIO NA  $a_w$  DAS FORMULAÇÕES DE MORTADELA TESTADAS  
FONTE: O autor (2015)

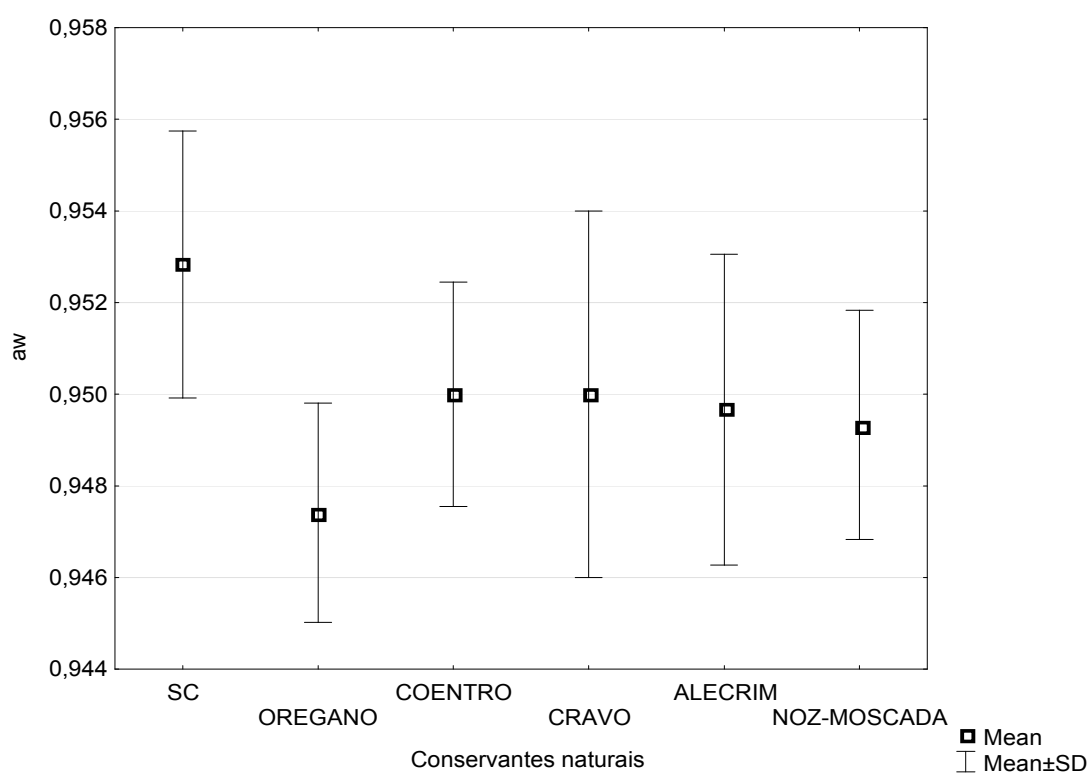


FIGURA 11 - INFLUÊNCIA DOS CONSERVANTES NATURAIS NA  $a_w$  DAS FORMULAÇÕES DE MORTADELAS TESTADAS.  
FONTE: O autor (2015)

Com a adição dos conservantes naturais verifica-se uma pequena redução na atividade de água, o mesmo ocorrendo com a adição do lactato de sódio, porém neste caso ocorreu uma variação mais acentuada. Segundo Dodds e Austin (2001), para cepas de *Clostridium botulinum* do tipo A e B o crescimento ocorre em  $a_w$  acima de 0,94. Neste caso a  $a_w$  pode ter influenciado na germinação dos esporos. Segundo Shelef (1994) um dos mecanismos para a ação bacteriostática do lactato de sódio baseia-se na sua capacidade em diminuir a atividade de água do alimento.

#### 4.2 RESULTADO DO NITRITO RESIDUAL AO LONGO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO

Para análise do nitrito residual utilizou-se o método oficial do Ministério da Agricultura conforme descrito anteriormente na seção de materiais e métodos (subitem 3.2.6). Inicialmente elaborou-se a curva padrão de nitrito de sódio (anexo 4), e calculou-se o coeficiente de correlação corrigido ( $R^2$ ), o qual foi igual a 0,9954. Isto indica que ocorreu linearidade entre os pontos pois o coeficiente  $R^2$  foi maior que 0,99 que é o valor mínimo aceito para que o método seja considerado linear (BASQUES, 2007). Com os valores da curva padrão calculou-se o fator da curva de nitrito de sódio (F), o qual foi igual a 20,12. Com este valor determinou-se as concentrações de nitrito residual utilizando a equação da metodologia:

$$\text{Concentração de NaNO}_2 (\mu\text{g/g}) = \text{Absorbância (nm)} \times 25 \times F / \text{peso da amostra (g)}$$

Os dados obtidos de nitrito residual nas mortadelas durante os 60 dias de estocagem a 28°C para as formulações 1,7,13, e 19 são apresentados na tabela 15. Escolheu-se estas formulações para acompanhamento do nitrito residual pois as mesmas combinam os níveis de nitrito de sódio e lactato de sódio estudados conforme descrito abaixo:

- Formulação 1: 60ppm de nitrito sem lactato.

- Formulação 7: 60ppm de nitrito com 1,2% de lactato.
- Formulação 13: 120ppm de nitrito sem lactato
- Formulação 19: 120ppm de nitrito com 1,2% de lactato.

TABELA 15 - RESULTADO DO NITRITO RESIDUAL NAS MORTADELAS AO LONGO DOS 60 DIAS DE ESTOCAGEM A 28°C

Dia	Nitrito residual (ppm)			
	Formulação 1	Formulação 7	Formulação 13	Formulação 19
0	19,87	15,04	46,93	32,64
3	17,71	12,22	38,51	21,73
6	9,20	9,31	22,69	13,53
9	3,97	5,99	14,54	9,76
12	3,47	4,88	5,99	9,56
15	3,17	3,42	4,43	7,95
18	2,82	3,49	4,07	6,49
21	2,72	2,77	4,28	6,19
24	2,26	2,11	3,87	4,43
27	2,26	>2,0	3,66	4,02
30	2,16	>2,0	2,72	3,97
33	>2,0	>2,0	2,26	2,57
36	>2,0	>2,0	>2,0	2,06
39	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
42	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
45	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
48	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
51	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
54	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
57	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
60	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Análises foram realizadas até encontrar um residual abaixo de 2ppm, a partir deste ponto não foram mais realizadas as análises pela dificuldade de leitura na escala do espectrofotômetro

O residual de nitrito após o processo de produção depende de vários fatores como: pH do meio, tempo entre a mistura do produto e o final do tratamento térmico, temperatura de acondicionamento do produto, carga microbiana presente na matéria prima, e adição de antioxidantes (PARDI et al., 1996). Segundo este autor em torno de 10% do nitrito adicionado permanece após 7 dias. Observando-se a tabela 15 verifica-se que os valores encontrados ficaram próximos do preconizado por Pardi e colaboradores. Segundo Hustad et al. (1973) e Kudryashow (2008) dois terços do nitrito são perdidos durante o período de tempo que compreende entre sua adição e o final do tratamento térmico. Observando-se a tabela 15 verifica-se que para as formulações 1 e 13 os valores ficaram próximos do que os autores citaram. Nas formulações 7 e 19 o valor residual de nitrito em ficou em torno de 25% do adicionado,

valor um pouco inferior do descrito pelos autores. Vários fatores podem influenciar nestes valores, até o tempo entre a adição do nitrito e adição do antioxidante. Adicionando-se o antioxidante muito rapidamente após o nitrito ocorre a formação de nitrato diminuindo o nitrito residual. Isto ocorre, pois, a reação do antioxidante com o nitrito se exerce com relativa rapidez, formando um excesso de óxido nítrico no meio, o qual ultrapassa as necessidades para formação do pigmento nitrosomioglobina, fazendo com que o óxido nítrico restante oxide-se com o oxigênio do meio formando o nitrato como produto final estável (MÖHLER,1992).

#### 4.3 RESULTADO DA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE *C. sporogenes* NAS MORTADELAS DURANTE O PERÍODO DE INCUBAÇÃO.

Na tabela 16 pode ser observado o resultado obtido com a combinação dos conservantes no tempo para germinação dos esporos de *C. sporogenes* durante os 60 dias de incubação para todas as formulações de mortadelas testadas.

TABELA 16 - NÚMERO DE AMOSTRAS DE MORTADELA COM GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *C. sporogenes* POR NÚMERO DE AMOSTRAS INOCULADAS COM ESPOROS, PARA CADA EXPERIMENTO DURANTE O TEMPO DE ESTOCAGEM (CONTINUA)

DIA/FORM.	0/1	0/2	0/3	0/4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0																												
4	2/5	3/5	4/5	1/5																								
5	5/5	5/5		5/5		3/5	1/5	4/5	5/5	2/5																		
6			5/5			5/5	4/5			4/5																		
7					3/5		5/5	5/5		5/5																		
8																												
9					5/5																							
10																2/5												
11																3/5						1/5						
12																												
13													1/5								1/5							
14																	1/5										1/5	
15															1/5	4/5							1/5					
16											2/5	1/5				5/5			1/5									
17											4/5	5/5	3/5	1/5			3/5	1/5										
18																	4/5					2/5	2/5	1/5				
19																										1/5	2/5	
20																												
21											5/5		4/5				5/5				2/5							
22															2/5													
23																												
24															3/5				2/5			3/5			1/5			
25																		3/5					3/5					
26																			3/5									3/5
27													5/5					4/5										
28															4/5						3/5			1/5				
29																						4/5						
30																			4/5	2/5								

FONTE: O autor (2015)

TABELA 16 - NÚMERO DE AMOSTRAS DE MORTADELA COM GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *C. sporogenes* POR NÚMERO DE AMOSTRAS INOCULADAS COM ESPOROS, PARA CADA EXPERIMENTO DURANTE O TEMPO DE ESTOCAGEM (CONCLUSÃO)

DIA/FORM.	0/1	0/2	0/3	0/4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
31																		5/5		3/5	4/5							
32																												
33														3/5					5/5					2/5				
34															5/5													
35																												
36																												
37																												
38																			4/5		5/5		3/5					
39																												
40														4/5													2/5	
41																												
42																				5/5			4/5					
43																												
44																						4/5						
45														5/5														
46																										3/5		
47																											4/5	
48																							5/5					
49																												
50																												
51																								2/5				
52																												
53																												
54																												
55																												
56																												
57																												
58																												
59																												
60																			*5/5			5/5		5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

FONTE: O autor (2015)

NOTA: \* As amostras marcadas em 60 dias não tiveram germinação de esporos, porém para tratamento estatístico foram consideradas tóxicas com 60 dias.

Na tabela 17 são apresentados as médias aritméticas e os desvios padrão do tempo (em dias) que levou para ocorrer a germinação dos esporos de *C. sporogenes* em cada formulação de mortadela, e também a média aritmética em cada grupo, onde manteve-se o nitrito e o lactato constantes e variou-se apenas o conservante natural utilizado.

TABELA 17: MÉDIAS ARITMÉTICAS DO TEMPO (EM DIAS) PARA OCORRER A GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE *C. sporogenes* EM CADA FORMULAÇÃO DE MORTADELA TESTADA

FORMULAÇÃO	Média de dias para ocorrer a germinação dos esporos em cada formulação	Média de dias para ocorrer a germinação dos esporos nos grupos com nitrito e lactato constantes
0/1 – ponto zero – 0% NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - SCN	5(±1)	5(±1)
0/2 – ponto zero - 0% NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - SCN	4(±1)	
0/3 – ponto zero - 0% NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - SCN	4(±1)	
0/4 – ponto zero - 0% NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - SCN	5(±0)	
1 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - SCN	8(±1)	6(±1)
2 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - 0,2% extr. orégano	5(±1)	
3 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - 0,2% OE coentro	6(±1)	
4 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - 0,17% OE cravo	5(±1)	
5 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - 0,2% OE alecrim	5(±0)	
6 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - 0,2% OE noz-moscada	6(±1)	
7 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - SCN	17(±2)	21(±8)
8 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - 0,2% extr. orégano	17(±0)	
9 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - 0,2% OE coentro	19(±5)	
10 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - 0,17% OE cravo	34(±11)	
11 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - 0,2% OE alecrim	25(±7)	
12 - 60ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - 0,2% OE noz-moscada	13(±3)	
13 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - SCN	17(±3)	26(±10)
14 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - 0,2% extr. orégano	25(±5)	
15 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - 0,2% OE coentro	26(±6)	
16 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - 0,17% OE cravo	38(±13)	
17 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - 0,2% OE alecrim	27(±11)	
18 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> - 0% LS - 0,2% OE noz-moscada	24(±10)	
19 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - SCN	32(±19)	40(±17)
20 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - 0,2% extr. orégano	36(±11)	
21 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - 0,2% OE coentro	52(±14)	
22 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - 0,17% OE cravo	47(±19)	
23 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - 0,2% OE alecrim	45(±17)	
24 - 120ppm NaNO <sub>2</sub> – 1,2% LS - 0,2% OE noz-moscada	28(±12)	

FONTE: O autor (2015)

Analisando-se tabela 17, verificou-se que a adição de 60ppm de nitrito de sódio não influenciou negativamente a germinação dos esporos de *C. sporogenes* quando comparados com o ponto zero, na temperatura de 28°C em que o experimento foi estudado. Este resultado comprova os estudos de Hustad et al. (1973), que em salsichas armazenadas a 27°C foi necessária a adição de 100ppm de nitrito para evitar a germinação de esporos de *C. botulinum*. Este resultado também confirma os dados obtidos por Jarvis et al. (1979), que encontraram maior inibição ao *C. botulinum* com níveis de nitrito entre 75 a 125ppm adicionados em carne suína moída.

Mantendo-se 60ppm de nitrito de sódio e adicionando-se 1,2% de lactato de sódio observou-se um aumento na média de dias para a germinação dos esporos de 6 dias para 21 dias. Isto mostra que o lactato nesta concentração possui uma atividade contra a germinação dos esporos, o que pode ser explicado pela diminuição da *aw* do produto. Isto confirma os estudos de Meyer et al. (2003) que com a adição de 2,5% de lactato de sódio em carne de peru cozida sem adição de nitrito aumentou o tempo para germinação de esporos de *C. sporogenes* de 8 para 22 dias. Pesquisas realizadas por Houtsma et al. (1994) e Mass, Glass, Doyle (1989) também demonstraram que com o aumento da concentração de lactato de sódio adicionado em peito de peru cozido aumentou o tempo para produção de toxina do *C. botulinum*. Nos tratamentos com adição de 60ppm de nitrito e 1,2% de lactato de sódio também se observou que houve influência dos OE's de cravo e de alecrim, pois os tempos para germinação dos esporos foram de 34 e 25 dias, superiores ao valor médio encontrado de 21 dias.

Nas formulações onde foi usado 120ppm de nitrito de sódio, sem adição de lactato de sódio observou-se um aumento no tempo para germinação dos esporos para 26 dias em média, valor maior que nos tratamentos anteriores. Isto confirma que o nitrito é um conservante eficaz no controle de bactéria do gênero *Clostridium*, e que com o aumento de sua concentração aumenta sua eficácia. Nesta concentração de nitrito com 120ppm também se observou que quando adicionado os OE's de cravo houve um aumento no tempo para germinação, mostrando um certo sinergismo entre o nitrito de sódio e estes OE.

Nos tratamentos onde utilizou-se 120ppm de nitrito de sódio com 1,2% de lactato de sódio houve um aumento da média para germinação dos esporos para 40 dias, comprovando os estudos dos autores citados anteriormente que quanto maior a concentrações de nitrito e lactato de sódio maior a inibição das bactérias do gênero



*Clostridium*. Nos tratamentos onde foram adicionados OE's de coentro, cravo, e de alecrim observou-se que ocorreu um aumento do tempo para germinação dos esporos, em relação à média. Os valores encontrados foram de 52 dias para adição de 0,20% de OE de coentro, 47 dias para adição de 0,17% de OE de cravo e 45 dias para adição de 0,2% de OE de alecrim.

A adição dos conservantes naturais de extrato de orégano (0,20%), e OE de noz-moscada (0,20%) não alteraram o tempo para germinação dos esporos em relação ao tempo médio em cada grupo. O resultado encontrado por Ismael e Pierson (1990), onde 400ppm de OE de orégano combinado com 50ppm e 100ppm de nitrito de sódio mostrou um efeito inibitório na germinação de esporos de *C. botulinum*, quando comparado apenas com a adição de nitrito não foi comprovado. Isto pode ter ocorrido porque ao contrário do presente estudo, onde utilizou-se extrato de orégano (0,20%) os pesquisadores citados utilizaram 0,04% de OE de orégano. O resultado encontrado para o OE de noz-moscada (0,20%) no presente estudo diferiu do encontrado por Cui, Gabriel, Nakano (2010), em seus estudos *in vitro* mesmo utilizando como meio carne cozida. Os autores encontraram sinergismo entre 10ppm de nitrito de sódio e 0,05% de OE de noz-moscada. No presente estudo utilizando um modelo real (mortadela) não foi encontrado nenhum sinergismo entre estes componentes. Isto vem ao encontro aos estudos de Leuschner e Ielsch (2003), que concluíram que em modelos reais é necessária uma maior quantidade dos compostos naturais para obter os mesmos resultados obtidos *in vitro*. Também como descrito por Burt (2004) e Lis-Bauchin, Steyrl, Krenn (2003) o alto teor de gordura presente em produtos cárneos tem efeito negativo sobre a atividade antimicrobiana dos OE's, devido à maior solubilidade dos óleos essenciais na parte lipídica, do que na parte aquosa do alimento.

O teor residual de nitrito de sódio conforme observado na tabela 18, não teve influência no crescimento dos esporos de *C. sporogenes*, comprovando os estudos realizados por Gibson et al. (1984) onde os autores relatam que não é o residual de nitrito o responsável pela ação antibotulínica em produtos cárneos e sim teor de nitrito adicionado ao produto. Verifica-se na tabela 18 que ocorre um aumento dos dias para germinação dos esporos com o aumento da adição de nitrito, e com a presença de lactato. Observa-se que ocorreu germinação dos esporos de *C. sporogenes* com teores de nitrito residual entre 7,95ppm a >2,00ppm. Observando-se as tabelas 16 e 17 verifica-se que algumas amostras não apresentaram germinação de esporos

mesmo quando o teor residual de nitrito foi de praticamente igual a 0ppm, comprovando que o teor residual de nitrito não influencia na germinação dos esporos.

TABELA 18: INFLUÊNCIA DO NITRITO ADICIONADO E DO NITRITO RESIDUAL NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE *C. sporogenes* NAS FORMULAÇÕES ONDE REALIZOU-SE O ACOMPANHAMENTO DO NITRITO RESIDUAL

Formulação	Média de dias para ocorrer a germinação dos esporos	Teor de nitrito de sódio adicionado	Faixa residual de nitrito onde ocorreu a germinação dos esporos
1	8( $\pm$ 1)	60ppm	7,45ppm a 3,97ppm
7	17( $\pm$ 2)	60ppm c/lactato	3,49ppm a 2,77ppm
13	17( $\pm$ 3)	120ppm	4,62ppm a 4,28ppm
19	32( $\pm$ 19)	120ppm c/lactato	7,95ppm a >2,00ppm

FONTE: O autor (2015)

#### 4.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS PARA O TEMPO PARA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE *C. sporogenes*

Primeiramente testou-se o modelo para verificar se o mesmo seria significativo. Para isto utilizou-se os testes de Desviance e Qui-quadrado de Pearson. Para os dois casos, as estatísticas não foram significativas pois apresentaram  $p > 0,05$  ( $p = 2,287$  e  $p = 2,195$  respectivamente), implicando que o modelo proposto é significativo (ANEXO 5). Confirmado modelo realizou-se o teste de significância de cada fator e suas interações, utilizando o teste de Qui-quadrado de Wald, sendo o resumo dos resultados apresentados na tabela 18.

TABELA 18: RESULTADO DO TESTE DE SIGNIFICÂNCIA DAS INTERAÇÕES DE SEGUNDA E TERCEIRA ORDEM DO MODELO, UTILIZANDO O TESTE DE QUI-QUADRADO DE WALD

Interações de segunda e terceira ordem	Valor p
Nitrito*Lactato	0,000
Nitrito*Conservantes naturais	0,031
Lactato*Conservantes naturais	0,010
Nitrito*Lactato* Conservantes naturais	0,000

FONTE: O autor (2015)

Os resultados apresentados na tabela 18 indicam que tanto as interações de segunda ordem como as de terceira ordem foram significativas, pois valor  $p < 0,05$  em todos os casos. A figura 12 mostra os indicativos destas interações.

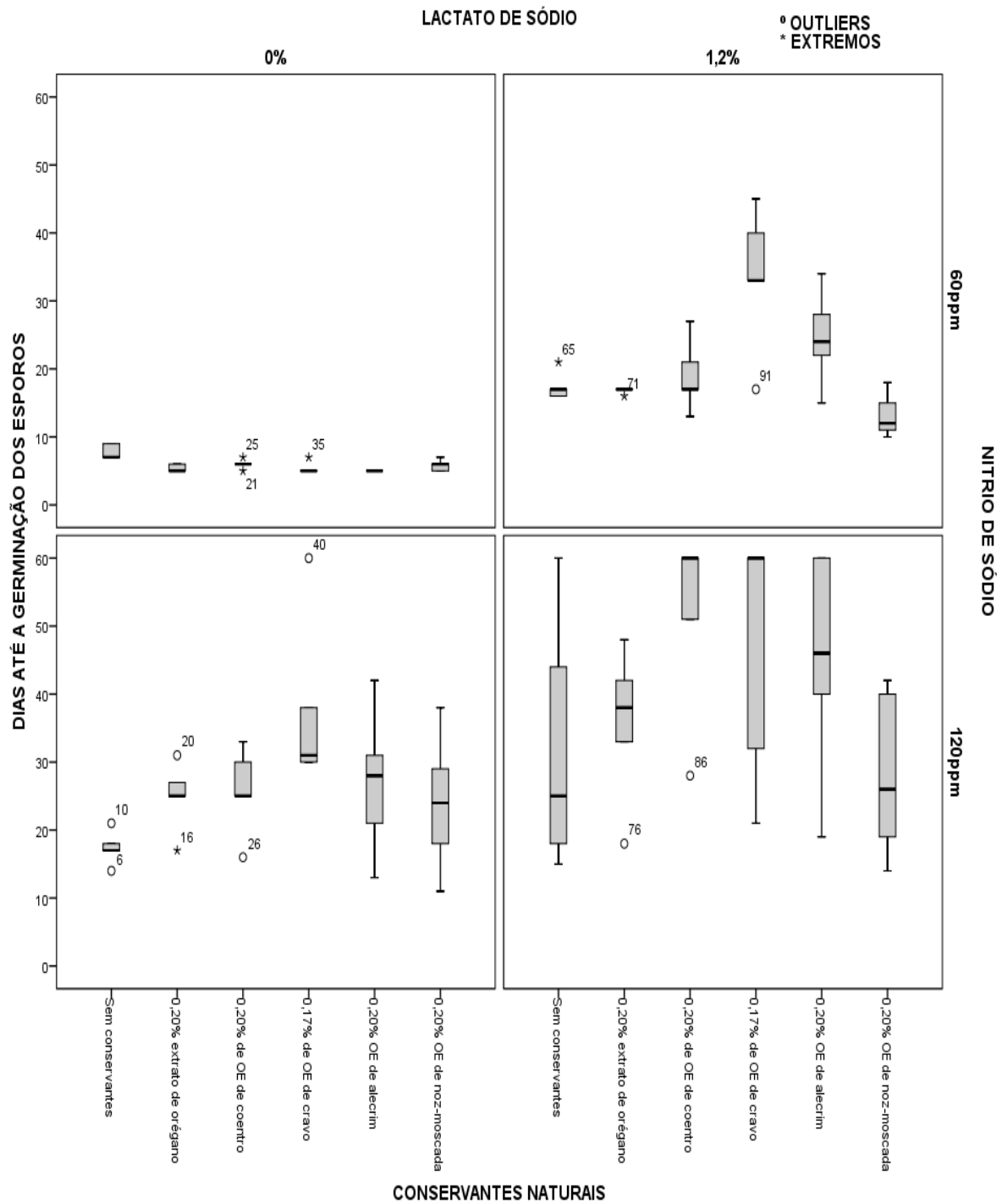


FIGURA 12: INFLUÊNCIA DAS COMBINAÇÕES DE NITRITO DE SÓDIO, LACTATO DE SÓDIO, E CONSERVANTES NATURAIS, NO TEMPO (EM DIAS) PARA OCORRER A GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE *C. sporogenes*.

FONTE: O autor (2015)

Observando-se a figura 12 percebe-se que a adição de lactato de sódio aumenta o tempo necessário para germinação dos esporos. Sem adição de lactato o tempo variou aproximadamente de 5 a 40 dias, e com adição de 1,2% de lactato de sódio este tempo aumentou aproximadamente de 10 a 60 dias. Isto confirma os estudos realizados por Houtsma et al. (1994) e Mass, Glass, Doyle (1989), descritos anteriormente, que quanto maior a concentração de lactato de sódio maior sua eficácia contra bactérias do gênero *Clostridium*. A figura 12 também demonstra que quando aplicados os níveis de 120ppm de nitrito de sódio e 1,2% de lactato de sódio os valores do tempo para germinação dos esporos aumentam consideravelmente ocorrendo alguns valores no tempo de 60 dias onde não ocorreu a germinação dos esporos.

A figura 12 também indica possíveis interações entre os óleos essenciais de cravo, alecrim e coentro com lactato de sódio e nitrito de sódio, pois percebe-se que um aumento do tempo para germinação dos esporos quando estes óleos essenciais são adicionados em conjunto com o nitrito e/ou lactato.

A tabela 19 resume os resultados para os testes de interações significativas (tanto de segunda como terceira ordem), nela são apresentados os níveis descritivos (p-valor) para estatística de Wald. Estas interações são significativas considerando o nível  $\alpha=0,05$ .

TABELA 19: RESULTADO DAS INTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS DOS MODELOS DE SEGUNDA E TERCEIRA ORDEM, ONDE FORAM COMBINADOS NITRITO DE SÓDIO, LACTATO DE SÓDIO, E OS CONSERVANTES NATURAIS

<b>MODELO DE SEGUNDA ORDEM</b>	
<b>Interação</b>	<b>Valor de p</b>
120ppm de nitrito de sódio * 0,17% OE de cravo	p=0,000
1,2% de lactato de sódio * 0,20% OE de coentro	p=0,001
1,2% de lactato de sódio * 0,20% OE de alecrim	p=0,034
<b>MODELO DE TERCEIRA ORDEM</b>	
<b>Interação</b>	<b>Valor de p</b>
60ppm de nitrito de sódio * 1,2% de lactato de sódio * 0,17% OE de cravo	p=0,001
60ppm de nitrito de sódio * 1,2% de lactato de sódio * 0,20% de OE de alecrim	p=0,014
120ppm de nitrito de sódio * 1,2% de lactato de sódio * 0,20% de OE de coentro	p=0,001
120ppm de nitrito de sódio * 1,2% de lactato de sódio * 0,20% de OE de alecrim	p=0,034

FONTE: O autor (2015)

Aplicando-se o teste de avaliação do efeito de interação entre as variáveis, provou-se estatisticamente que ocorreu interação entre 120ppm de nitrito de sódio com 0,17% de OE de cravo, esta interação ocorreu no modelo de segunda ordem. No modelo de terceira ordem também apareceu interação entre 60ppm de nitrito com 1,2% de lactato de sódio e 0,17% de OE de cravo. Apesar de aparecer interação entre nitrito, lactato e o OE de cravo, pelo resultado obtido no modelo de segunda ordem conclui-se que o maior sinergismo ocorre entre o nitrito e o OE de cravo. Estes resultados comprovam a existência de sinergismo entre nitrito de sódio com OE de cravo no controle da germinação de esporos de *Clostridium sporogenes* em mortadela. Estes resultados vêm de encontro aos obtidos por Cui, Gabriel, Nakano (2010), que utilizaram “*in vitro*” meio modificado de carne cozida e utilizaram 10ppm de nitrito de sódio com 0,05% de OE de cravo, e obtiveram uma redução de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos nas células vegetativas de *Clostridium botulinum*. Com os resultados obtidos da interação entre nitrito de sódio e OE de cravo nas mortadelas testadas conclui-se que a combinação destes compostos pode ser usada nestes produtos com eficácia, devendo apenas avaliar se a concentração utilizada não interfere sensorialmente nos produtos processados. Caso a concentração de 0,17% de OE de cravo interferir negativamente na parte sensorial do produto pode-se testar se menores concentrações do OE de cravo combinado com nitrito de sódio também serão eficazes para controlar a germinação de esporos do *Clostridium sporogenes*.

A tabela 19 indica também interação de segunda ordem entre 1,2% de lactato de sódio com 0,20% de OE de coentro e no modelo de terceira ordem interação entre 120ppm de nitrito de sódio, 1,2% de lactato de sódio e 0,20% de OE de coentro. Apesar de aparecer interação entre nitrito, lactato e o OE de coentro, pelo resultado obtido no modelo de segunda ordem conclui-se que o maior sinergismo ocorre entre o lactato de sódio e o OE de coentro. Estes resultados indicam a existência de sinergismo entre 1,2% de lactato de sódio com 0,20% de OE de coentro no controle da germinação de esporos de *Clostridium sporogenes* em mortadela. Também como na utilização do OE de cravo, a utilização de 0,20% de OE de coentro deve ser avaliada sensorialmente no produto final, ou avaliar se a utilização de menores quantidades combinadas com lactato de sódio serão eficazes para controlar a germinação dos esporos de *C. sporogenes*.

Tivemos também interações de terceira ordem com o OE de alecrim como mostra a tabela 19. Verificou-se que ocorreram interações significativas entre 60ppm de nitrito de sódio, 1,2% de lactato de sódio, e 0,20% de OE de alecrim, e interações entre 120ppm de nitrito de sódio, 1,2% de lactato de sódio e 0,20% de OE de alecrim. Nos dois casos somente apareceram interações quando utilizados os três componentes juntos, isto indica que quando os mesmos são utilizados em conjunto apresentam um certo sinergismo no controle da germinação do *C. sporogenes*. Resultados encontrados por Cui, Gabriel, Nakano (2010) para concentração inibitória mínima “*in vitro*” de OE de alecrim contra o *C. sporogenes* e *C. botulinum*, em meio de cultura TPGY, foi de 0,5%. Neste trabalho utilizou-se uma concentração menor de apenas 0,2% de OE de alecrim, que quando combinado com nitrito de sódio e lactato de sódio mostrou ser eficaz, quando aplicado em um modelo real, no caso mortadela, comprovando o sinergismo entre os compostos utilizados. Neste caso a questão sensorial deve ser melhor estudada avaliando-se a influência de 0,20% de OE de alecrim no produto final.

Vários estudos foram publicados sobre a utilização de lactato de sódio em produtos cárneos no controle do *C. botulinum* (MASS, GLASS, DOYLE, 1989; MILLER, CALL, WHITING, 1993; HOUTSMA, et al., 1994; KALINOWSKI E TOMPKIN, 1999; MEYER et al., 2003), porém em todos estes estudos foram necessárias concentrações acima de 2% de lactato de sódio para obter-se alguma ação antimicrobiana contra o *C. botulinum*. No presente estudo utilizou-se uma concentração de apenas 1,2% de lactato de sódio, a qual apresentou resultados significativos no controle da germinação dos esporos de *C. sporogenes*, quando combinado com 0,20% de OE de coentro, e com nitrito de sódio (60ppm e 120ppm) e 0,20% de OE de alecrim. Os fatos acima descritos reforçam que realmente ocorreu sinergismo entre o lactato de sódio com os outros compostos (nitrito de sódio, OE de coentro, e OE de alecrim).

O trabalho realizado mostrou que tanto OE de cravo, de coentro e de alecrim podem vir a ser usados em combinação com nitrito de sódio e/ou lactato de sódio para controle do *C. botulinum* em produtos cárneos com eficácia. As concentrações destes compostos utilizadas neste estudo atendem a legislação vigente no Brasil, e as mesmas podem ser usadas como medida preventiva para o desenvolvimento do *C. botulinum* em mortadela conservada em temperatura ambiente (+24°C), durante o período de validade de 60 dias, ou em outros produtos cárneos, devendo-se apenas

avaliar aspectos sensoriais do produto final. Também após ter sido comprovado o sinergismo entre os compostos citados, outras concentrações dos mesmos podem ser avaliadas buscando resolver possíveis problemas sensoriais que venham ocorrer no produto final.

## 5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos na pesquisa pode-se concluir que:

- Ocorreu uma interação, estatisticamente comprovada, entre nitrito de sódio e OE de cravo (0,17%) no controle da germinação de esporos de *C. sporogenes*, quando esta combinação foi aplicada no modelo real (mortadela).
- Ocorreu uma interação, estatisticamente comprovada, entre lactato de sódio (1,20%) e OE de alecrim (0,20%) no controle da germinação de esporos de *C. sporogenes*, quando esta combinação foi aplicada no modelo real (mortadela).
- Ocorreu uma interação, estatisticamente comprovada, entre nitrito de sódio (60ppm e 120ppm), lactato de sódio (1,2%) e OE de alecrim (0,20%) no controle da germinação de esporos de *C. sporogenes*, quando esta combinação foi aplicada no modelo real (mortadela).
- Adição de 60ppm de nitrito de sódio sem lactato de sódio, não apresentou nenhum efeito microbiológico para controle do *C. sporogenes*, indicando que esta concentração é insuficiente para controlar a produção de toxina botulínica em produtos cárneos.
- Adição de 1,2% de lactato de sódio juntamente com 60ppm de nitrito de sódio aumentou o tempo para germinação dos esporos de 6 dias para 21 dias, indicando que o lactato de sódio apresenta ação bacteriostática no controle do *C. sporogenes*, sendo sua ação foi correlacionada com a redução da atividade de água na mortadela.
- Os óleos essenciais de noz-moscada e coentro na concentração de 0,2%, quando aplicados a um modelo real (mortadela), não apresentaram ação antimicrobiana contra o *C. sporogenes*, o mesmo acontecendo com o extrato de orégano na mesma concentração, mesmo quando combinados com nitrito de sódio e/ou lactato de sódio.



## REFERÊNCIAS

- AMSTALDEN, V. C. J.; SERRANO, A. M.; MANHANI, M. R. Avaliação da toxigênese de *C. botulinum* em mortadela e presunto. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 154-159, mai-ago, 1997.
- ARIDOGAM, B. C.; BAYDAR, H.; KAYA, S.; DEMIRCY, M.; OZBASAR, D.; MUMCU, E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Archives Pharmacal Research**, Seoul, v. 25, n. 6, p. 860-864, dec. 2002.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 18 th. ed. Gaithsburg, method: 978.18, 2005.
- AURELI, P.; COSTANTINI, A.; ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 5, p. 344-348, May. 1992.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, feb. 2008.
- BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os Recursos Vegetais Aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para produção de aromas e sabores**. EDUFES, 2008. p. 623.
- BASQUES, J. C. **Validação quantitativa**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 34 Belo Horizonte. Jun. 2007. Disponível em: <http://www.labest.com.br>. Acesso em 12 mar. 2015.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common Fragrance and Flavor Materials: preparation, properties and uses**. 3th. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. p. 293.
- BEUCHAT, L.R.; GOLDEN, D. A. Antimicrobials occurring naturally in foods. **Food Technology**, Chicago, v. 43, p. 134-142, 1989.
- BRADBURY, M.; GREENFIELD, P.; MIDGLEY, D.; LI, D.; TRAN-DINH, N.; VRIESEKOOP, F.; BROWN, J. L. Draft genome sequence of *C. sporogenes* PA 3679, the common nontoxigenic surrogate for proteolytic *C. botulinum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, n. 6, p. 1631-1632, march 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Ofício n.º AUP 235/90, de 15 de janeiro de 1990. Autoriza o emprego de lactato de sódio como coadjuvante tecnológico na preparação de carnes destinadas a fabricação de produtos à base de carnes a proporção de 2% sobre o produto final. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 jan. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 35, de 28 de abril de 1995. Conceder a extensão do uso do aditivo lactato de sódio, com a função umectante, código U.V, ano alimento relacionado (embutido de carne), obedecendo ao limite máximo focado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 mai. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 1004, de 11 de dezembro de 1998. Aprovar o Regulamento Técnico: “Atribuição de Função de Aditivos. Aditivos e seus Limites Máximos para uso para a Categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 dez. 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 20, de 21 de julho de 1999. Oficializa os Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes – Sal e Salmoura. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 21 jul. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 04, de 31 de março de 2000. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, D.F., 31 mar. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 21 jul. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Integrado de Vigilância Epidemiológica do Botulismo**. – Brasília: D.F., Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 51, de 29 de dezembro de 2006. Adota o Regulamento Técnico de atribuição de Aditivos, e seus Limites das seguintes Categorias de Alimentos 8: Carne e Produtos

Cárneos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, D.F., 04 jan. 2007. Seção 1, Página 14.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 02, de 15 de janeiro de 2007. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Aditivos e Aromatizantes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 jan. 2007a, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA. Ofício Circular n.º 15, de 08 de maio de 2009. **Uso de conservantes/aditivos em produtos cárneos – Procedimentos de registro e fiscalização.** – Brasília: D.F., 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 36, de 13 de outubro de 2011. Altera a redação dos açúcares totais constantes nos subitens 4.2.2 dos anexos II e IV da Instrução Normativa n.º 4 de 31 de julho de 2000. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, D.F., 13 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância Epidemiológica do Botulismo.** – Brasília: D.F., Editora do Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN). Botulismo: versão internet. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em: 22/02/2014.

BROWN, J. L.; TRAN-DINH, N.; CHAPMAN, B. *Clostridium sporogenes* PA 3679 and its uses in the derivation of thermal processing schedules for low-acid shelf-stable foods and as a research model for proteolytic *Clostridium botulinum*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 75, n. 4, p. 779-792, 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 223-253, 2004.

BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSI, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 207-211, 2008.

CARRAMINANA, J. J.; ROTA, C.; BURILLO, J.; HERRERA, A. Antibacterial efficiency of Spanish *Satureja montana* essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 3, p. 502-508, 2008.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION CDC. Foodborne, botulism from eating Home-Pickled Eggs – Illinois. 1997. **CDC**, Atlanta, v. 49, n. 34, p. 57-61, 2000.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION CDC. National surveillance of bacterial foodborne illnesses (enteric diseases) – Atlanta, august 2014. <http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/botulism-surveillance.html> Acesso em: 01/05/2015.

CERESER, N. D.; COSTA, R. F. M.; JÚNIOR, O. D. R.; SILVA, D. A. R.; SPEROTTO, V. R. Botulismo de Origem Alimentar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 280-287, jan-fev, 2008.

CHOULIARA, E.; KARATAPANIS, A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on *shelf life* extension of fresh chicken breast meat, stored at 4°C. **Food Microbiology**, Philadelphia, v. 24, n. 6, p. 607-617, 2007.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p.130-135, 1999.

CRADDOCK, V. M. Aetiology of oesophageal cancer: some operative factors. **Europeun Journal of Cancer Prevention**, v. 1, p. 89-103, 1992.

CUI, H.; GABRIEL, A. A.; NAKANO, H. Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. **Food Control**, Guildford, v. 21, p. 1030-1036, 2010.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G.; GC-MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 48, p. 2576-2581, 2000.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G.; The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinérea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003.

DAVIDSON, P. M., NAIDU, A. S. Phytophenols. In: A. S. NAIDU (Ed.). **Natural food Antimicrobial Systems**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2000. p. 265-295.

DAVIDSON, P. M. Conservantes químicos y compuestos antimicrobianos naturales. In: DOYLE, P. MICHAEL; BEUCHAT, R. LARRY; MONTVILLE, J. THOMAS. **Microbiología de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2001. p. 546-579.

DEANS, S. G; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, p. 165-180, 1987.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G.; Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 101-109, 2002.

DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D. K. Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O. scabrum* Boiss et Heldr from Greece. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, p. 460-462, 2001.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULE, N. A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 703-714, Dec. 2004.

DODDS, K. L.; AUSTIN, J. W. *Clostridium botulinum*. In: DOYLE, P. MICHAEL; BEUCHAT, R. LARRY; MONTVILLE, J. THOMAS. **Microbiología de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2001. p. 301-318.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 88, p. 308-316, 2000.

DUTRA, C. B.; RATH, S.; REYES, G. R. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v. 18, n. 1, p. 111-120, jan/mar, 2007.

EDUARDO, M.B.P.; MELLO, M. L. R.; KATSUYA, E. M.; CAMPOS, J. C.; PIMENTA, N. B.; KITAGAWA, B. Y. **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água: *Clostridium botulinum*/Botulismo**. São Paulo: Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2002. 41p.

EFSA Journal. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products, **EFSA Journal**, vol. 14, p. 1-34, 2003.

FAN, T. Y.; TANNENBAUM, S. R. Stability of N-nitroso compounds. **Journal of Food Science**, v. 37, p. 274, 1972.

FARAG, R. S.; DAW, Z. Y.; HEWEDI, F. M.; EL-BAROTY, G. S. A. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, n. 9, p. 665-667, 1989.

FERRACCIOLI, V. R. **Avaliação da qualidade de salsichas do tipo *Hot Dog* durante o armazenamento**. 2012. Dissertação (Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) Instituto Mauá de Tecnologia, Escola de Engenharia Mauá, São Caetano do Sul, 2012.

FREAN, J.; ARNTZEN, L.; HEERER, J. V. D.; PEROVIC, O. Fatal type A botulism in South Africa, 2002. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, p. 290-295, 2004.

FRIDMAN, A. L.; MUKHAMETSHIN F. M.; NOVIKOV, S. S. Advances in the chemistry of aliphatic N-nitrosamines. **Russian Chemical Reviews**, v. 40, p. 30, 1971.

GLASS, K. A.; JOHNSON, E. A. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acid. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 675-682, Dec. 2004.

GIBSON, A. M.; ROBERTS, T.A.; ROBINSON, A. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized cured meats VI. Nitrite monitoring during storage of pasteurized pork slurries. **Journal of Food Technology**, United Kingdom, v. 19, p. 29-44, 1984.

GILL, A. O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, p. 83-92, 2002.

GOULD, G. W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, Des Moines, supplement, p. 82-86, 1996.

GROSSO, C.; FERRARO, V.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; COELHO, J. A.; PALAVRA, A. M. Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. **Journal Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 197-203, 2008.

HARPAZ, S.; GLATMAN, L.; DRABKIN, V.; GELMAN, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p. 410-417, 2003.

HAUSCHILD, A. H. W.; JARVIS, G.; RAYMOND, D. P. Contribution of nitrite to the control of *Clostridium botulinum* in liver sausage. **Journal of Food Protection**, Ames, Iowa, v. 45, p. 500-506, 1982.

HAYOUNI, E. A.; CHRAIEF, I.; ABEDRABBA, M. BOUIX, M.; LEVEAU, J. Y.; MOHAMMED, H. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against Salmonella inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 3, p. 242-251, 2008.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.-L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

HOUTSMA, P. C.; HEUVELINK, A.; DUFRENNE, J.; NOTERMANS, S. Effect of sodium lactate on toxin production, spore germination and heat resistance of proteolytic *Clostridium botulinum* strains. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 57, p. 327-330, 1994.

HUSTAD, G. O.; CERVENY, J. G.; TRENK, H.; DEIBEL, R. H.; KAUTTER, D. A.; FAZIO, T.; JOHNSTON, R. W.; KOLARI, O. E. Effect of sodium nitrite and sodium nitrate on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, p.22-26, jul., 1973.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: SES – CCD - IAL, 2005, 1020 p.

ISMAIEL, A. A.; PIERSON, M. D. Effect of sodium nitrite and oregano oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG both and ground pork. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, p. 958-960, 1990.

JARVIS, B.; RHODS, A. C.; PATEL, M. Microbiological safety pasteurized cured meats: Inhibition of *Clostridium botulinum* by curing salts and other additives. In: JARVIS, B.; CHRISTIAN, J. H. B.; MICHENER, H. D. **Food Microbiology and Technology**. Parma: Medicina Viva Servizio Congressi, 1979, p. 251.

JAY, M. J.; LOESSNER, J. M.; GOLDEN, A. D. Protección de los alimentos con sustancias químicas y mediante biocontrol. In: \_\_\_\_\_. **Microbiología Moderna de Los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2005, p. 311-315.

JOHNSON, E. A.; BRADSHAW, M. *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. **Toxicon**, Oxford, v. 39, p.1703-1722, 2001.

JUNEJA, V. K.; THIPPAREDDI, H. Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *Clostridium perfringens* from spore inoculate during chilling of marinated ground turkey breast. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 93, p. 155-163, 2004.

JUNQUEIRA, V. C. A.; SERRANO, A. M.; MANHANI, M. R. Avaliação da toxigenase de *C. botulinum* em mortadela e presunto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, may/ago, 1997.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 76, p.626-631, 1994.

KALINOWSKI, R. M.; TOMPKIN, R. B. Psychotropic clostridia causing spoilage in cooked meat and poultry products. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 62, n. 7, p. 766-772, 1999.

KARATZAS, A. K.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J.; BENNIK, M. H. J. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 463-469, 2001.

KETCHAM, E.M.; GOMEZ, H.F. Infant botulism: a diagnostic and management challenge pediatric perspective. **Air Medical Journal**, Orlando, v. 22, n. 5, p. 6-11, 2003.



KUDRYASHOW, Personal communication. In: HONIKEL, K.-O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, Barking, v. 78, p. 68-76, 2008.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 453-462, 2001.

LEISTNER, L. Combined methods for food preservation. In M.S. Rahman (Ed.), **Handbook of food preservation**. p. 457-485. New York: Marcel Dekker, Inc, 1999.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 55, n. 1/3, p. 181-186, Apr. 2000.

LENS-LISBONNE, C.; CREMIEUX, A.; MAILLARD, C.; BALANSARD, G. Methodes d'évaluation de l'activité antibacterienne des huiles essentielles: application aux essences de thym et de cannelle. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v.42, n. 5, p. 297-302, 1987.

LEUSHNER, R. G. K.; IELSCH, V. Antimicrobial effects of garlic, clove, and res rot chilli on *Listeria monocytogenes* in both systems and soft cheese. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 54, p. 127-133, 2003.

LIDON, F.; SILVESTRE, M. M. **Indústrias Alimentares: Aditivos e Tecnologia**. 1ª edição, Lisboa: Escolar Editora, 2007.

LIS-BALCHIN, M.; STEYRL, H.; KRENN, E. The comparative effect of novel Pelargonium essential oils and their corresponding hydrosols as antimicrobial agents in a model food system. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 60-65, 2003.

MAAS, M. R.; GLASS, K. A.; DOYLE, M. P. Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 2226-2229, sept. 1989.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 62, n. 9, p. 1017-1023, 1999.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiacea* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, p. 187-195, 2001.

MEJLHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 27-31, 2002.

MENDOZA-YEPES, M. J.; SANCHEZ-HIDALGO, L. E.; MAERTENS, G. MARIN-INIESTA, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, v. 17, p. 47-55, 1997.

MERCOSUL. Resolução GMC n.º 73/1997. Regulamento técnico Mercosul de atribuição de aditivos e seus limites nas seguintes categorias de alimentos: categoria 8 – carnes e produtos derivados. Disponível em: [http://www2.uol.com.br/actasof/actamercosul/espanhol/res\\_73\\_97.htm](http://www2.uol.com.br/actasof/actamercosul/espanhol/res_73_97.htm). Acesso em: 01/05/2015.

MEYER, J. D.; CERVENY, J. G.; LUCHANSKY, J. B. Inhibition of nonproteolytic, psychrotrophic clostridia and anaerobic sporeformers by sodium diacetate and sodium lactate in cook-in-bag turkey breast. **Journal Food Protect**, v. 66, n.º 8, p. 1474-1478, 2003.

MILLER, A.J.; CALL, J.E.; WHITING, R.C. Comparison of organic acid salts for *Clostridium botulinum* control in an uncured turkey product. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 56, p. 958-962, 1993.

MÖHLER, K. **El curado**. Zaragoza; Ed. Acribia, 1982.

MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Antibacterial activity of essential oil components. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 16, p. 337-342, 1992.

MOREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, Guildford, v. 13, p. 289-292, 2002.

NYCHAS, G. J. E. Natural antimicrobials from plants, In: GOULD, G. W. (Ed.). **New Methods of Food Preservation**, New York: Chapman & Hall, 1995. p. 58-89.

OLIVEIRA, M. J., ARAÚJO, W. M. C., BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguças do tipo frescal, **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, n.º **25** (4), p 736-742, 2005.

OLIVEIRA, T. L. C. **Atividade do óleo essencial de segurelha (*Satureja montana* L.) sobre *Clostridium perfringens* em sistemas de emulsão cárneas elaborados com diferentes níveis de nitrito**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

OOSERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E. J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteriostatic compound. **Industrial Crops and Products**, v. 4, p. 23-31, 1995.

PACKIVASOTHY, E. V. and KYLE, S. Antimicrobial properties of some herb essential oils. **Food Australia**, v.54, p. 384-387, 2002.

PANDIT, V. A.; SHELEF, L. A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Microbiology**, v. 11, p. 57-63, 1994.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. Processamento tecnológico da carne. In. \_\_\_\_\_. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 1ª ed., vol. 2. Goiania: Editora da UFG, 1996. p. 719-840.

PARLAMENTO EUROPEU. Decreto-lei 33/2008. Estabelece as condições a que deve obedecer a utilização dos aditivos alimentares, com exceção dos corantes edulcorantes. **Diário da República nº 39**, I série de 25 de fevereiro de 2008, p.1215-1221.

PASTER, N.; JUVEN, B. J.; SHAAYA, E.; MENASHEROV, M.; NITZAN, R.; WEISSLOWICZ, H.; RAVID, U. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on molds and foodborne bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, p. 33-37, 1990.

PENNINGTON, J. A. T. Dietary nitrates exposure models for nitrates and nitrites, **Food Control**, Wageningen v.9, n. 6 (9), p. 385-395, 1998.

PERIAGO, P. M.; MOEZELAAR, R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the variability of different strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, p. 141-148, 2001.

PERIAGO, P. M.; PALOP, A.; FERNANDEZ, P. S. Combined effect of nisin, carvacrol and tymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. **Food Science and Technology International**, v. 7, p. 487-492, 2001.

PINILLOS, M. A.; GÓMEZ, J.; ELIZALDE, J.; DUEÑAS, A. Intoxicación por alimentos, plantas y setas. **Anales Del Sistema Sanitário de Navarra**. Pamplona, v. 26, suppl.1, p. 71-76, 2003.

PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P.; JULIANO, C.; BOATTO, G.; TOMI, F.; CHESSA, M.; CERRI, R.; CASANOVA, J.; Chemical composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 15-19, 2002.

PIVNICK, H.; BARNETT, H. W.; NORDIN, H.R.; RUBIN, L. J. Factors affecting the safety of canned, cured, shelf-stable luncheon meat inoculated with *Clostridium botulinum*. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.2, p. 141-148, 1969.

PRINDLE, R. F.; WRIGHT, E. S. Phenolic compounds. In BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, Sterilization and Preservation**, 4 ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1977.

RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D. C.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária. **Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

REDDY, D., LANCASTER, J. R., CORNFORTH, D. P. Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*: Electron spin resonance detection of iron-nitric oxide complexes. **Science**, Washington, n. 221, p 769-770, 1983.

Regulation (EC) n.º 2232/96 of the European Parliament and of the Council of 28 October 1996 laying down a community procedure for flavouring substances used or intended for use in or on foodstuffs. **Official Journal of the European Parliament**, 1996, p. 1-4.

Regulation (EC) n.º 622/2002 of 11 april 2002 establishing deadlines for the submission of information of chemically defined flavouring substances used in or on foodstuffs. **Official Journal Commission of the European Communities**, Brussels, Belgium, 2002, p. 10-11.

RIBEIRO, J. L. D.; TEN CATEN, C. S. **Projeto de Experimentos**, Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, 2011.

RICO-MUÑOZ, E.; BARGIOTA, E.; DAVIDSON, P. M. Effect of selected phenolic compounds on the membrane-bound adenosine triphosphate of *Staphylococcus aureus*. **Food Microbiology**, v. 4, p. 239-249, 1987.

ROBINSON, A.; GIBSON, A. M.; ROBERTS, T. A. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized cured meats. V. Prediction of toxin production: non-linear effects of storage temperature and salt concentration. **Journal of Food Technology**, United Kingdom, v. 17, p. 727-744, 1982.

ROÇA, R. O. **Cura de carnes**. Botucatu, 2000. Disponível em: <<http://fca.unesp.br>>. Acesso em 24/08/2013;

SAKOMOTO, P. Desafios na carne não-curada. **Aditivos & Ingredientes**, São Paulo, v. 61, p. 79-83, mar-abr, 2009.

SEBRANEK, J. G.; BACUS, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? **Meat Science**, Barking, v. 77, p. 136-147, 2007.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of lactates: a review. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 57, p. 445-450, 1994.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. . **Journal Biological Chemistry**, v. 269, p.8022-8028, 1994.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKIEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2007. 1102 p.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 1011-1022, 2001.

SMITH, LOUIS DS. Las esporas. In:\_\_\_\_\_.**Botulismo, El microorganismo, sus toxinas, la enfermedad**. Zaragoza: Acribia, 1980.

SMITH, R. L.; COHEN, S. M.; DOULL, J.; FERON, U. J.; GOODMAN, J. I.; MARNETT, L. J.; PORTOGHESE, P. S.; WADDELL, B. M.; WAGNER, B. M.; HALL, R. L.; HIGLEY, N. A.; LUCAS-GALVIN, C.; ADAMS, T. B.; A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food; essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 245-363, 2005.

STEGEMAN, D., VERKLEIJ, T. J. Reducing the amount of nitrites in the production of pasteurized organic meat products, **Agrotechnology and Food Sciences Group**, Holanda, Ministério da Agricultura, Nature and Food Quality, Report n.º 940, 2008.

STEKELENBURG F. K.; KANT-MUERMANS M. L. T. Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 66, p. 197-203, 2001.

TASSOU, C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4°C and 10°C. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78 p. 593-600, 1995.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 52, n. 6, p. 339-403, 1989.

TOMPKIN, R. B.; DAVISON, P. M.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in Food**. 3rd. ed. New York: Marcel Dekker, 1983. Cap 8, p. 205.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. J. E. Behavior of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p. 901-909, 2000.

ULTEE, A. Bactericidal action of carvacrol towards the food pathogen *Bacillus cereus*. **A Case Study of a Novel Approach to Mild Food Preservation**. Wageningen, the Netherlands. Wageningen University, 2000. p. 97.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A.; SMID, E. J.; Adaptation of food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 4, p. 233-238, 2000.

ULTEE, A.; SLUMP, R. A.; STEGING, G.; SMID, E. J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 63, p. 620-624, 2000.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p. 373-378, 2001.

ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1561-1568, 2002.

UNDA, J. R.; MOLINS, R.A.; WALKER, H. W. Clostridium sporogenes and listeria monocytogenes: Survival and inhibition in microwave-ready beef roasts containing selected antimicrobials. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, p 198, 1991.

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Guaíba: Agropecuária, 2003. 56 p.

VANDAR-UNLU.; CANDAN, F.; SOKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; DONMEZ, E.; TEPE, B. Antimicrobial and antitoxic activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus*. (*Lamiaceae*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 1, p. 63-67, Jan. 2003.

VIGIL, A. L.; PALOU, E.; ALZAMORA, S. M.; Naturally occurring compounds – plant sources. In: DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. (Ed.). **Antimicrobials in Food**. 3rd ed. New York: CRC Press, 2005. p. 429-451.

WALSH, S. E.; MAILLARD, J. Y.; RUSSELL, A. D.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D.L.; BARTOLO, R. G. Activity and mechanism of action of selective biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.94, n.2, p. 240-247, Aug. 2003.

WENDAKOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 56, p. 410-413, 1993.

WENDAKOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacte aerogenes* by active components in spices. **Journal Food Protect**, Des Moines, v. 58, n. 3, p. 280-283, 1995.

WHO – World Health Organization. **Toxicological evaluation of certain food additives**: forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Committee on Foods Additives. Geneva: WHO, 1996. (Food Additives Series, 35).

WHO – World Health Organization. **Safety evaluation of certain food additives**: forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Committee on Foods Additives. Geneva: WHO, 2003. (Food Additives Series, 50).

WHO – World Health Organization, **Ingested nitrate and nitrite and cyanobacterial peptide toxins**, IARC monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans, vol. 94, Lyon, France, p. 462, 2010.

WILKINS, K. M.; BOARD, R. G. Natural antimicrobial systems. In: GOULD, G. W., (Ed.). **Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures**. New York: Elsevier Science Publishers Ltda, 1989. p. 285-362.

WOODS, L. F. J.; WOOD, J. M.; GIBBS, P. A. The involvement of nitric oxide in the inhibition of phosphoroclastic system in *Clostridium sporogenes* by sodium nitrite. **Journal of General Microbiology**, v. 125, p. 399-406, 1981.

ZHANG, H.; KONG, B.; XIONG, Y. L.; SUN, X. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. **Meat Science**, Barking, v. 81, p. 686-692, 2009.



## ANEXOS

ANEXO 1 -	Método oficial preconizado pelo Ministério da Agricultura para análise de nitritos.....	112
ANEXO 2 -	Tabela da ANOVA para as determinações de pH das formulações de mortadela.....	114
ANEXO 3 -	Tabela da ANOVA para as determinações de <i>aw</i> das formulações de mortadela.....	115
ANEXO 4 -	Curva padrão de nitrito de sódio.....	116
ANEXO 5 -	Resultado do teste de avaliação do modelo.....	117
ANEXO 6 -	Resultado do teste de significância das interações de segunda e terceira ordem do modelo, utilizando o teste de Qui-quadrado de Wald.....	118
ANEXO 7 -	Formatação dos dados utilizados para cálculo das interações significativas do modelo.....	119
ANEXO 8 -	Tabela com resultado das interações dos modelos de segunda e terceira ordem, onde foram combinados nitrito de sódio, lactato de sódio, e os conservantes naturais.....	121
ANEXO 9 -	Ficha técnica do óleo essencial de alecrim.....	123
ANEXO 10 -	Ficha técnica do lactato de sódio.....	124
ANEXO 11 -	Ficha técnica do eritorbato de sódio.....	126
ANEXO 12 -	Ficha técnica do tripolifosfato de sódio.....	127
ANEXO 13 -	Ficha técnica do glutamato monossódico.....	128
ANEXO 14 -	Ficha técnica do nitrito de sódio.....	129
ANEXO 15 -	Ficha técnica da proteína isolada de soja.....	130
ANEXO 16 -	Ficha técnica do corante carmim cochonilha.....	131

ANEXO 1 - Método oficial preconizado pelo Ministério da Agricultura para análise de nitritos.

## NITRITOS

### 1. Princípio

Baseia-se na reação de diazotação de nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. O produto resultante é determinado espectrofotometricamente a 540 nm.

### 2. Material

#### 2.1. Equipamentos:

Balança analítica;  
Banho-maria;  
Espectrofotômetro.

#### 2.2. Vidraria, utensílios e outros:

Balões volumétricos de 50 e 250mL;  
Béquer de 50mL;  
Erlenmeyers de 250 ou 500mL;  
Funil;  
Papel de filtro qualitativo;  
Pipeta graduada de 5mL;  
Pipetas volumétricas de 5, 10 e 20mL.

#### 2.3. Reagentes:

Solução de tetraborato de sódio decahidratado ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) a 5%;  
Solução de ferrocianeto de potássio trihidratado ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) a 15% (p/v);  
Solução de sulfato de zinco heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ou acetato de zinco dihidratado ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 30% (p/v);  
Solução de sulfanilamida ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ) a 0,5% (p/v);  
Dissolver 1,25 g de sulfanilamida em 250mL de solução de ácido clorídrico (1+1). A solução é estável por 1 a 2 meses;  
Solução de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$ ) a 0,5% (p/v):  
Dissolver 0,5 g de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina em 100mL de água deionizada. Estocar em frasco âmbar sob refrigeração. A solução deve ser desprezada quando apresentar alteração da coloração;  
Solução padrão estoque de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) p.a..  
a) Usando nitrito de prata ( $\text{AgNO}_2$ ) p.a.:  
Pesar 0,5g de nitrito de prata e dissolver em 100mL de água quente. Transferir a solução, quantitativamente, para balão volumétrico de 1000mL. Pesar 0,25g de cloreto de sódio, adicionar ao balão, completar o volume e homogeneizar. Deixar decantar. Pipetar 5mL do sobrenadante para balão volumétrico de 100mL e completar o volume; 1mL desta solução corresponde a 10g de nitrito de sódio;  
b) Usando nitrito de sódio:

Pesar 0,5g de nitrito de sódio de pureza mínima de 99% previamente seco por 24 horas em dessecador, transferir para balão volumétrico de 500mL e completar o volume. Pipetar 1mL da solução para balão volumétrico de 100mL e completar o volume, 1mL desta solução corresponde a 10 g de nitrito de sódio.

Curva padrão de nitrito de sódio:

Pipetar alíquotas de 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1,0 - 1,5 - 2,0 e 2,5mL da solução de nitrito de sódio a 10 g/ml para balões volumétricos de 50mL. Adicionar, a cada um, 5mL de solução de sulfanilamida a 0,5%, aguardar 3 minutos e adicionar 3mL de solução de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina a 0,5%, agitando após cada adição. Completar o volume e homogeneizar. Deixar em repouso por 30 minutos e ler a 540 nm contra um branco dos reagentes. Calcular o fator F de correção da curva.

### 3. Procedimento

Pesar 10g de amostra homogeneizada em béquer de 50mL. Transferir para erlenmeyer de 500mL com o auxílio de 100mL de água deionizada quente. Adicionar 5mL solução de tetraborato de sódio a 0,5%. Deixar em banho-maria por 15 minutos, agitando frequentemente. Esfriar à temperatura ambiente. Com o auxílio de um funil e bastão de vidro, passar o conteúdo do erlenmeyer, quantitativamente, para balão volumétrico de 250mL. Lavar bem o erlenmeyer com aproximadamente 50mL de água deionizada quente (60°C). Deixar esfriar. Adicionar 5mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 5mL de solução de sulfato ou acetato de zinco a 30%. Agitar por rotação após a adição de cada reagente e completar o volume com água. Filtrar em papel de filtro qualitativo. Transferir 10mL do filtrado para balão volumétrico de 50mL. Adicionar 5mL de solução de sulfanilamida a 0,5%, deixar reagir por 3 minutos, adicionar 3mL de solução de cloreto de alfa-naftiletilenodiamina a 0,5%, agitando após cada adição. Completar o volume com água deionizada e homogeneizar. Deixar em repouso por 30 minutos e ler a 540 nm. Fazer um branco correspondente.

### 4. Cálculos

$$m \text{ g/mL nitrito de sódio} = \frac{A \times 25 \times F}{p}$$

Onde:

A = absorvância da amostra;

F = fator da curva de nitrito de sódio;

p = massa da amostra em gramas;

### BIBLIOGRAFIA

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II –Métodos físicos e químicos. Brasília, 1981. Cap.2,p.17:Salsicharia.

MERCK. Reativos. Diagnóstica. Produtos químicos.1992/93. [S.I.], 1993. 1584p.

ANEXO 2 - Tabela da ANOVA para as determinações de pH das formulações de mortadela.

Variável dependente: PH

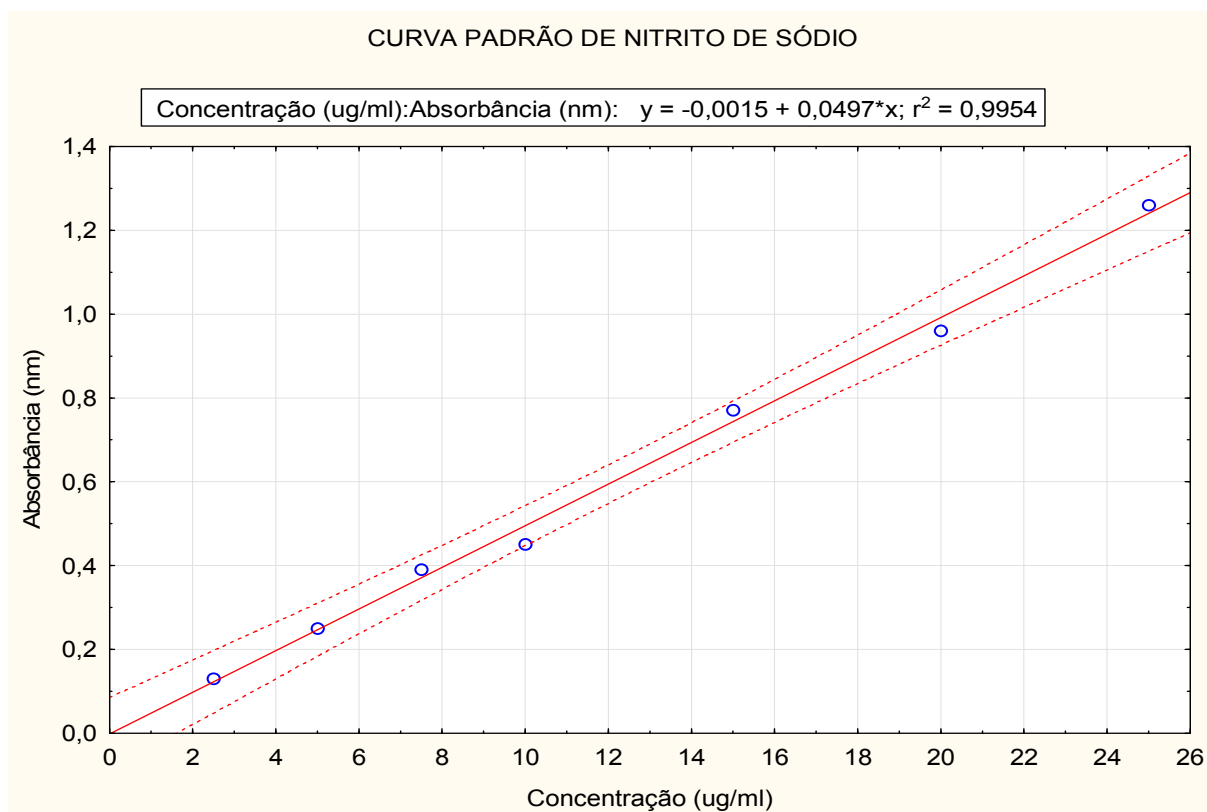
Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Modelo corrigido	,072 <sup>a</sup>	24	,003	9,884	,000
Interceptação	3233,732	1	3233,732	10703517,97	,000
Nitrito	,005	2	,002	7,912	,001
Lactato	,007	1	,007	22,526	,000
Conservantes	,005	5	,001	3,240	,012
Nitrito * Lactato	,005	1	,005	16,550	,000
Nitrito * Conservantes	,006	5	,001	4,156	,003
Lactato * Conservantes	,025	5	,005	16,811	,000
Nitrito * Lactato * Conservantes	,020	5	,004	13,284	,000
Erro	,018	59	,000		
Total	3686,505	84			
Total corrigido	,089	83			

ANEXO 3 - Tabela da ANOVA para as determinações de  $a_w$  das formulações de mortadela.

Variável dependente:  $A_w$

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Modelo corrigido	,001 <sup>a</sup>	24	4,369E-5	23,242	,000
Interceptação	66,478	1	66,478	35361955,43	,000
Nitrito	4,042E-6	2	2,021E-6	1,075	,348
Lactato	,001	1	,001	298,480	,000
Conservantes	,000	5	3,111E-5	16,550	,000
Nitrito * Lactato	1,389E-8	1	1,389E-8	,007	,932
Nitrito * Conservantes	5,903E-6	5	1,181E-6	,628	,679
Lactato * Conservantes	3,279E-5	5	6,558E-6	3,489	,008
Nitrito * Lactato * Conservantes	8,557E-5	5	1,711E-5	9,103	,000
Erro	,000	59	1,880E-6		
Total	75,823	84			
Total corrigido	,001	83			

## ANEXO 4 - Curva padrão de nitrito de sódio.



## ANEXO 5 - Resultado do teste de avaliação do modelo.

**Goodness of Fit<sup>b</sup>**

	Value	df	Value/df
Deviance	263,048	115	2,287
Scaled Deviance	263,048	115	
Pearson Chi-Square	252,402	115	2,195
Scaled Pearson Chi-Square	252,402	115	
Log Likelihood <sup>a</sup>	-448,938		
Akaike's Information Criterion (AIC)	947,876		
Finite Sample Corrected AIC (AICC)	959,279		
Bayesian Information Criterion (BIC)	1021,417		
Consistent AIC (CAIC)	1046,417		

Dependent Variable: Dias

Model: (Intercept), Nitrito \* Lactato, Nitrito \* Conservantes, Nitrito \*  
Lactato \* Conservantes, Lactato \* Conservantes

a. The full log likelihood function is displayed and used in  
computing information criteria.

b. Information criteria are in small-is-better form.

ANEXO 6 - Resultado do teste de significância das interações de segunda e terceira ordem do modelo, utilizando o teste de Qui-quadrado de Wald

TESTES DE EFEITO DO MODELO			
Source	Type III		
	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Intercept)	12447,273	1	,000
Nitrito * Lactato	65,057	1	,000
Nitrito * Conservantes	12,304	5	,031
Nitrito * Lactato * Conservantes	23,526	5	,000
Lactato * Conservantes	15,131	5	,010

Dependent Variable: Dias

Model: (Intercept), Nitrito \* Lactato, Nitrito \* Conservantes, Nitrito \*

Lactato \* Conservantes, Lactato \* Conservantes



ANEXO 7 - Formatação dos dados utilizados para cálculo das interações significativas do modelo.

Caso/número	Nitrito	Lactato de sódio	Conservantes	Dias p/ germinação
0/1	0	0	SC	4
0/2	0	0	SC	4
0/3	0	0	SC	5
0/4	0	0	SC	5
0/5	0	0	SC	5
0/6	0	0	SC	4
0/7	0	0	SC	4
0/8	0	0	SC	4
0/9	0	0	SC	5
0/10	0	0	SC	5
0/11	0	0	SC	4
0/12	0	0	SC	4
0/13	0	0	SC	4
0/14	0	0	SC	4
0/15	0	0	SC	6
0/16	0	0	SC	4
0/17	0	0	SC	5
0/18	0	0	SC	5
0/19	0	0	SC	5
0/20	0	0	SC	5
1	60	0	SC	7
2	60	0	SC	7
3	60	0	SC	7
4	60	0	SC	9
5	60	0	SC	9
6	120	0	SC	14
7	120	0	SC	17
8	120	0	SC	17
9	120	0	SC	18
10	120	0	SC	21
11	60	0	OREGANO	5
12	60	0	OREGANO	5
13	60	0	OREGANO	5
14	60	0	OREGANO	6
15	60	0	OREGANO	6
16	120	0	OREGANO	17
17	120	0	OREGANO	25
18	120	0	OREGANO	25
19	120	0	OREGANO	27
20	120	0	OREGANO	31
21	60	0	COENTRO	5
22	60	0	COENTRO	6
23	60	0	COENTRO	6
24	60	0	COENTRO	6
25	60	0	COENTRO	7
26	120	0	COENTRO	16
27	120	0	COENTRO	25
28	120	0	COENTRO	25
29	120	0	COENTRO	30
30	120	0	COENTRO	33
31	60	0	CRAVO	5
32	60	0	CRAVO	5
33	60	0	CRAVO	5
34	60	0	CRAVO	5
35	60	0	CRAVO	7
36	120	0	CRAVO	30
37	120	0	CRAVO	30
38	120	0	CRAVO	31
39	120	0	CRAVO	38
40	120	0	CRAVO	60
41	60	0	ALECRIM	5
42	60	0	ALECRIM	5
43	60	0	ALECRIM	5
44	60	0	ALECRIM	5
45	60	0	ALECRIM	5
46	120	0	ALECRIM	13

47	120	0	ALECRIM	21
48	120	0	ALECRIM	28
49	120	0	ALECRIM	31
50	120	0	ALECRIM	42
51	60	0	NOZ-MOSCADA	5
52	60	0	NOZ-MOSCADA	5
53	60	0	NOZ-MOSCADA	6
54	60	0	NOZ-MOSCADA	6
55	60	0	NOZ-MOSCADA	7
56	120	0	NOZ-MOSCADA	11
57	120	0	NOZ-MOSCADA	18
58	120	0	NOZ-MOSCADA	24
59	120	0	NOZ-MOSCADA	29
60	120	0	NOZ-MOSCADA	38
61	60	1,2	SC	16
62	60	1,2	SC	16
63	60	1,2	SC	17
64	60	1,2	SC	17
65	60	1,2	SC	21
66	120	1,2	SC	15
67	120	1,2	SC	18
68	120	1,2	SC	25
69	120	1,2	SC	44
70	120	1,2	SC	60
71	60	1,2	OREGANO	16
72	60	1,2	OREGANO	17
73	60	1,2	OREGANO	17
74	60	1,2	OREGANO	17
75	60	1,2	OREGANO	17
76	120	1,2	OREGANO	18
77	120	1,2	OREGANO	33
78	120	1,2	OREGANO	38
79	120	1,2	OREGANO	42
80	120	1,2	OREGANO	48
81	60	1,2	COENTRO	13
82	60	1,2	COENTRO	17
83	60	1,2	COENTRO	17
84	60	1,2	COENTRO	21
85	60	1,2	COENTRO	27
86	120	1,2	COENTRO	28
87	120	1,2	COENTRO	51
88	120	1,2	COENTRO	60
89	120	1,2	COENTRO	60
90	120	1,2	COENTRO	60
91	60	1,2	CRAVO	17
92	60	1,2	CRAVO	33
93	60	1,2	CRAVO	33
94	60	1,2	CRAVO	40
95	60	1,2	CRAVO	45
96	120	1,2	CRAVO	21
97	120	1,2	CRAVO	32
98	120	1,2	CRAVO	60
99	120	1,2	CRAVO	60
100	120	1,2	CRAVO	60
101	60	1,2	ALECRIM	15
102	60	1,2	ALECRIM	22
103	60	1,2	ALECRIM	24
104	60	1,2	ALECRIM	28
105	60	1,2	ALECRIM	34
106	120	1,2	ALECRIM	19
107	120	1,2	ALECRIM	40
108	120	1,2	ALECRIM	46
109	120	1,2	ALECRIM	60
110	120	1,2	ALECRIM	60
111	60	1,2	NOZ-MOSCADA	10
112	60	1,2	NOZ-MOSCADA	12
113	60	1,2	NOZ-MOSCADA	11
114	60	1,2	NOZ-MOSCADA	15
115	60	1,2	NOZ-MOSCADA	18
116	120	1,2	NOZ-MOSCADA	14
117	120	1,2	NOZ-MOSCADA	19
118	120	1,2	NOZ-MOSCADA	26
119	120	1,2	NOZ-MOSCADA	40
120	120	1,2	NOZ-MOSCADA	42

ANEXO 8 - Tabela com resultado das interações dos modelos de segunda e terceira ordem, onde foram combinados nitrito de sódio, lactato de sódio, e os conservantes naturais

Parameter Estimates							
Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Intercept)	3,178	,0913	2,999	3,357	1212,003	1	,000
[Nitrito=0] * [Lactato=1]	-1,663	,1390	-1,935	-1,390	143,115	1	,000
[Nitrito=1] * [Lactato=0]	-,598	,1532	-,898	-,297	15,219	1	,000
[Nitrito=1] * [Lactato=1]	-1,420	,2069	-1,826	-1,015	47,107	1	,000
[Nitrito=2] * [Lactato=0]	,161	,1242	-,082	,405	1,686	1	,194
[Nitrito=2] * [Lactato=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=0] * [Conservantes=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=1] * [Conservantes=1]	,296	,2452	-,184	,777	1,460	1	,227
[Nitrito=1] * [Conservantes=2]	-,071	,2674	-,596	,453	,071	1	,789
[Nitrito=1] * [Conservantes=3]	,034	,2604	-,477	,544	,017	1	,896
[Nitrito=1] * [Conservantes=4]	-,071	,2674	-,596	,453	,071	1	,789
[Nitrito=1] * [Conservantes=5]	-,148	,2729	-,683	,386	,296	1	,587
[Nitrito=1] * [Conservantes=6]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=2] * [Conservantes=1]	-,322	,1408	-,598	-,046	5,216	1	,022
[Nitrito=2] * [Conservantes=2]	,041	,1278	-,210	,291	,102	1	,749
[Nitrito=2] * [Conservantes=3]	,072	,1268	-,176	,321	,325	1	,569
<b>[Nitrito=2] * [Conservantes=4]</b>	<b>,454</b>	<b>,1167</b>	<b>,225</b>	<b>,683</b>	<b>15,146</b>	<b>1</b>	<b>,000</b>
[Nitrito=2] * [Conservantes=5]	,118	,1255	-,128	,364	,881	1	,348
[Nitrito=2] * [Conservantes=6]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=0] * [Lactato=1] * [Conservantes=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=1] * [Lactato=0] * [Conservantes=1]	-,020	,2946	-,597	,557	,005	1	,946
[Nitrito=1] * [Lactato=0] * [Conservantes=2]	,313	,3140	-,303	,928	,991	1	,319
[Nitrito=1] * [Lactato=0] * [Conservantes=3]	,330	,3058	-,269	,930	1,167	1	,280
<b>[Nitrito=1] * [Lactato=0] * [Conservantes=4]</b>	<b>1,006</b>	<b>,3043</b>	<b>,409</b>	<b>1,602</b>	<b>10,921</b>	<b>1</b>	<b>,001</b>
<b>[Nitrito=1] * [Lactato=0] * [Conservantes=5]</b>	<b>,771</b>	<b>,3127</b>	<b>,158</b>	<b>1,384</b>	<b>6,080</b>	<b>1</b>	<b>,014</b>
[Nitrito=1] * [Lactato=0] * [Conservantes=6]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=1] * [Lactato=1] * [Conservantes=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=1] * [Lactato=1] * [Conservantes=2]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=1] * [Lactato=1] * [Conservantes=3]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=1] * [Lactato=1] * [Conservantes=4]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=1] * [Lactato=1] * [Conservantes=5]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=1] * [Lactato=1] * [Conservantes=6]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=2] * [Lactato=0] * [Conservantes=1]	,460	,1819	,104	,817	6,406	1	,011

[Nitrito=2] * [Lactato=0] * [Conservantes=2]	,198	,1703	-,136	,532	1,349	1	,246
<b>[Nitrito=2] * [Lactato=0] * [Conservantes=3]</b>	<b>,536</b>	<b>,1644</b>	<b>,213</b>	<b>,858</b>	<b>10,615</b>	<b>1</b>	<b>,001</b>
[Nitrito=2] * [Lactato=0] * [Conservantes=4]	,048	,1581	-,262	,358	,092	1	,761
<b>[Nitrito=2] * [Lactato=0] * [Conservantes=5]</b>	<b>,350</b>	<b>,1652</b>	<b>,026</b>	<b>,673</b>	<b>4,480</b>	<b>1</b>	<b>,034</b>
[Nitrito=2] * [Lactato=0] * [Conservantes=6]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=2] * [Lactato=1] * [Conservantes=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=2] * [Lactato=1] * [Conservantes=2]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=2] * [Lactato=1] * [Conservantes=3]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=2] * [Lactato=1] * [Conservantes=4]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=2] * [Lactato=1] * [Conservantes=5]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Nitrito=2] * [Lactato=1] * [Conservantes=6]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Lactato=0] * [Conservantes=1]	,460	,1819	,104	,817	6,406	1	,011
[Lactato=0] * [Conservantes=2]	,198	,1703	-,136	,532	1,349	1	,246
<b>[Lactato=0] * [Conservantes=3]</b>	<b>,536</b>	<b>,1644</b>	<b>,213</b>	<b>,858</b>	<b>10,615</b>	<b>1</b>	<b>,001</b>
[Lactato=0] * [Conservantes=4]	,048	,1581	-,262	,358	,092	1	,761
<b>[Lactato=0] * [Conservantes=5]</b>	<b>,350</b>	<b>,1652</b>	<b>,026</b>	<b>,673</b>	<b>4,480</b>	<b>1</b>	<b>,034</b>
[Lactato=0] * [Conservantes=6]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Lactato=1] * [Conservantes=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Lactato=1] * [Conservantes=2]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Lactato=1] * [Conservantes=3]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Lactato=1] * [Conservantes=4]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Lactato=1] * [Conservantes=5]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Lactato=1] * [Conservantes=6]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: Dias

Model: (Intercept), Nitrito \* Lactato, Nitrito \* Conservantes, Nitrito \* Lactato \* Conservantes, Lactato \* Conservantes

a. Set to zero because this parameter is redundant.

b. Fixed at the displayed value.

\* nitrito 0=0ppm, nitrito 1=60ppm, nitrito 2=120ppm, lactato 1=0%, lactato 0=1,20%, conservante 1= sem

conservante, conservante 2=0,20% de extrato de orégano, conservante 3=0,20% de OE de coentro, conservante 4=0,17% de OE de cravo, conservante 5=0,20% de OE de alecrim, conservante 6=0,20% de OE de noz-moscada

## ANEXO 9 - Ficha técnica do óleo essencial de alecrim

**Ficha Técnica e Certificado de Qualidade****Descrição:** Óleo Essencial de Alecrim**Nome INCI:** Rosmarinus Officinalis (Rosemary) Leaf Oil**Cas No:** 84604-14-8 / 8000-25-7**Einecs No:** 283-291-9

ANALYTICAL DETAILS	RANGE	RESULT
APPEARANCE @ 20°C	Clear colourless mobile liquid	Conforms
ODOUR	Characteristic, clean, refreshing	Conforms
SPECIFIC GRAVITY @ 20°C	0.890 – 0.920	0.899
REFRACTIVE INDEX @ 20°C	1.450 – 1.470	1.4668
OPTICAL ROTATION @ 20°C	N/S	+8.0
FLASH POINT (°C)	40	Conforms
R 10 Flammable		

**GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS\***

CONSTITUENT	PERCENTAGE
ALPHA PINENE	27.11
CAMPHENE	3.64
BETA PINENE	5.66
PARACYMENE	1.57
1,8-CINEOLE + LIMONENE	41.08
CAMPHOR	9.85
CARYOPHILLENE BETA	2.5

## ANEXO 10 - Ficha técnica do lactato de sódio


**Especificação Técnica**  
 Rev.No.1/3011
**PURASAL® S**

<b>Descrição</b>	PURASAL S é o sal sódico do Ácido Láctico Natural L, que é produzido via fermentação de açúcar de cana. Tem sabor salino suave, propriedades antimicrobianas, pH neutro e solúvel em água. É amplamente usado na indústria de alimentos e cosméticos.	
<b>Especificação</b>	Produto	L-Lactato de sódio
	Aspecto	Líquido
<b>Concentração</b>	Concentração	58,8-61,2% w/w
	Teor de sódio	12,1-12,6% w/w
	Densidade a 20°C	1,32-1,34 g/ml
<b>Características visuais e sensoriais</b>	Cor fresca	max. 25 Apha
	Odor	passa teste
<b>Identificação</b>	Identificação de sódio e lactato	passa teste
	Pureza estereoquímica L(+)	min. 95%
<b>Pureza</b>	Cianeto	max. 0,3 ppm
	Chumbo	max. 2 mg/kg
	Citrato/oxalato/fosfato/tartarato	passa teste
	Açúcares	passa teste
	Metanol e metil ésteres	max. 0.025% w/w
	Cloreto	max. 0.03% w/w
	Sulfato	max. 0.003% w/w
	pH (direto)	6,5-8,5
	pH 10% (v/v)	6,0-7,5
<b>Propriedades físico químicas</b>	Fórmula molecular	CH <sub>3</sub> CHOHCOONa
	Peso molecular	112 (anidro)
	Nomenclatura	2-hidroxi propanoato de sódio

Copyright © Purac. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. Purac disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

**Registros**

CAS-Nr  
EEC – Aditivo alimenticio  
USA  
Cumprido com  
Ministério da Saúde do Brasil  
  
Ministério da Agricultura do  
Brasil/DIPOA  
Mercosul – aditivo alimenticio  
EC-Nr

**Especificação Técnica**

Rev.No.1/2011

867-56-1 (general 72-17-3)  
E 325  
GRAS  
FCC  
Isento de registro conforme  
resolução 23/00 ANVISA  
AUP 00611/2004  
  
INS 325  
212-762-3

Copyright © Purac. All rights reserved. No part of this publication may be copied, downloaded, reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopying, recorded or otherwise, without permission of the publisher. No representation or warranty is made as to the truth or accuracy of any data, information or opinions contained herein or as to their suitability for any purpose, condition or application. None of the data, information or opinions contained herein may be relied upon for any purpose or reason. Purac disclaims any liability, damages, losses or other consequences suffered or incurred in connection with the use of the data, information or opinions contained herein. In addition, nothing contained herein shall be construed as a recommendation to use any products in conflict with existing patents covering any material or its use.

## ANEXO 11 - Ficha técnica do eritorbato de sódio

	<b>ESPECIFICAÇÃO</b> <b>ERITORBATO DE SÓDIO</b> 521623	<b>REVISÃO 00</b>
		<b>DATA DE EDIÇÃO:</b> <b>23/02/2015</b>

**ERITORBATO DE SÓDIO** é um agente antioxidante e fixador de cor (INS 316), utilizado para produtos cárneos industrializados em geral.

Seus principais benefícios são: proteger contra a oxidação lipídica e de pigmentos, sequestrar metais, acelerar a cura, aumentar a durabilidade e uniformidade da cor e auxiliar na prevenção da formação de nitrosaminas em produtos curados.

**Instruções de uso:** Adicionar o **ERITORBATO DE SÓDIO** sobre a mistura a ser processada até completa homogeneização.  
**Dosagem:** 0,05% a 0,2% sob o produto final.

**Validade:** 12 meses em local seco e arejado, na embalagem original, ao abrigo da luz.

**Características Gerais**

Aspecto/cor  
Odor  
Sujidades/ Materiais Estranhos<sup>1</sup>  
OGM

Pó fino branco /creme  
Característico  
Ausência  
Livre

**Especificações Físico-Químicas**

Umidade<sup>1</sup>  
pH  
Máx. 0,25%  
5,5 - 8,0

**Especificações Microbiológicas**

*Salmonella* sp

Ausência em 25g

**Especificações Nutricionais (em 100g)**

Valor Energético 300 kCal / 1256 kJ  
Carboidratos 0g  
Proteína (N x 6,25) 0g  
Gorduras totais 0g  
Gorduras saturadas 0g  
Gordura *trans* 0g  
Fibra alimentar 0g  
Sódio 10600mg

**Contaminantes**

Chumbo

< 5 ppm

**Informações alergênicas**

Este produto não contém alergênicos em sua formulação, sendo fabricado em equipamentos que processam soja e seus derivados.  
Livre dos demais compostos alergênicos previstos na legislação da União Europeia.

**Informações Regulatórias**

- Resolução da Diretoria Colegiada 1004/98, da ANVISA.
- Resolução RDC 12 de 01 de Janeiro de 2001, ANVISA.

**Embalagem:** Saco de papel multifoldado revestido internamente com saco de polietileno, contendo 25kg do produto.

**Fracionamentos Disponíveis**

Tipo	Peso embalagem primária	Peso embalagem secundária
Saco	25kg	25kg

**Sugestão de Rotulagem:** Eritorbato de sódio.

<sup>1</sup>Informações que constam no certificado de análise que acompanha o produto



## ANEXO 12 - Ficha técnica do tripolifosfato de sódio



RQ 004.05  
Rev. MI  
Data 30/05/2011  
Pág. 1

**ESTABILIZANTE SOLÚVEL B027****DESCRICAO FICHA TECNICA**

Produto à base de estabilizantes (Fosfatos) utilizado para manter as características físicas dos produtos injetados. A sua principal função é de adequar o pH da carne, facilitando a dilatação das fibras e liberando as proteínas solúveis, aumentando assim a capacidade de retenção de umidade.

**Caract. Sensoriais**

Aspecto	Granul.
Sujidades/Materiais Estranhos	Ausência

**Caract. Físico-químicas**

Substâncias Voláteis à 130°C	0,00 à 2,00%
pH solução a 1%	8,50 à 10,50
Fosfatos em P2O5	56,00 à 60,00%

**Caract. Microbiológicas**

Pesq. de Salmonella sp.em 25g	Ausente
-------------------------------	---------

**COMPOSICAO DO PRODUTO**

Tripolifosfato de Sódio - estabilizante - INS 451i (100%)

**DESCRIPTIVO DE EMBALAGEM**

Pacotes de polietileno branco, com peso variável, acondicionados em saco de papel kraft, com revestimento interno de polietileno, devidamente identificado e adequados à conservação do produto.

**CONDICOES DE ESTOCAGEM**

Conservar o produto em local seco e ventilado à temperatura ambiente, dentro da embalagem original.

**VALIDADE DO PRODUTO**

360 dias.

**USO**

250 a 500g p/cada 100kg de massa.

**REGISTRO MS**

Isento Registro Conf.RDC 27 de 6 Agosto 2010.

## ANEXO 13 - Ficha técnica do glutamato monossódico

## FICHA TÉCNICA

AJINOMOTO®

**AJI-NO-MOTO®**  
**Cristal Regular****1. Descrição**

Cristal branco ou pó cristalino, praticamente inodoro, apresentando um gosto característico. JECFA, *Compendium of Food Additive Specifications*.

**2. Ingredientes**

L-Glutamato Monossódico

**3. Registro**

Dispensado de registro de acordo com a Resolução 23/00, item 5.1.6.2.

**4. Características físico-químicas**

Análises	Limites	Metodologia
Pureza	≥ 99%	JECFA* (MSG.H <sub>2</sub> O em base seca – titulação não aquosa)
Umidade	≤ 0,5%	JECFA* (98 °C, 5 h)
pH	6,7 - 7,2	JECFA* (solução 1g em 20 mL)
Rotação Específica [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	24,8° - 25,3°	JECFA* (10 g de amostra (base seca)/ 100 mL HCl 2N)
Cloretos como Cl	≤ 0,2%	JECFA* (Teste Limite para Cloretos)
Chumbo	≤ 1 mg/kg	JECFA* (Teste Limite para Chumbo)
Ácido Pirrolidone Carboxílico	passa no teste	JECFA* (TLC, solução Iodeto de Potássio/ Amido). Limite de detecção: 0,2%
1180 µm (16 Mesh) - retida	0%	AJIS 100-63 (100 g, 10 min, Ro-tap)
850 µm (20 Mesh) - 250 µm (60 Mesh) - retida	> 70%	AJIS 100-63 (100 g, 10 min, Ro-tap)
150 µm (100 Mesh) - passa	< 5%	AJIS 100-63 (100 g, 10 min, Ro-tap)

\* Métodos de Análises baseados no JECFA-Compendium of Food Additive Specifications, FAO Food and Nutrition Papers 52, volumes 1 e 2.

**5. Características microbiológicas**

Análises	Limites	Metodologia
Contagem Total (UFC/g)	≤ 500	AJIS 100-49-3-1 (Padrão Agar, x10)
Termoresistentes (UFC/g)	≤ 50	AJIS 100-49-3-2 (Padrão Agar, x10)
Bolores e Levedura (UFC/g)	≤ 50	AJIS 100-49-3-12 (PDA, x10)
Coliformes Totais	ausente	AJIS 100-49-3-3-(1) (BGLB, x10)
<i>Salmonella sp</i> em 25 g	ausente	American Public Health Association (APHA), 1992

AJINOMOTO DO BRASIL IND. E COM. DE ALIMENTOS LTDA.

REV. 02  
PÁG. 1/1

Atendimento ao Cliente  
+55 (11) 5080-6801  
vendas@br.ajinomoto.com

## ANEXO 14 - Ficha técnica do nitrito de sódio



RQ 004.05  
Rev. 01  
Data 14/11/2013  
Pág. 1

**SAL DE CURA P/EMBUTIDOS B001****DESCRICAO FICHA TECNICA**

Agente de cura e conservador composto de nitrito de sódio, veiculado em cloreto de sódio, elaborado para a utilização em produtos cozidos e defumados, como mortadelas, salsichas, lingüiças frescas e cozidas, salsichões, presuntos, apresetados e similares.

**Caract. Sensoriais**

Aspecto	Pó
Cor	Branco
Suiedades/Materiais Estranhos	Ausência

**Caract. Físico-químicas**

Cloretos Em NaCl(Sal Refinado)	91,00 à 97,00%
Substâncias Voláteis à 130°C	0,00 à 2,00%
pH solução a 1%	5,00 à 7,00
Nitrito De Sódio	5,00 à 6,00%

**Caract. Microbiológicas**

Pesq. de Salmonella sp.em 25g	Ausente
-------------------------------	---------

**COMPOSICAO DO PRODUTO**

Sal Refinado (94%) e Nitrito de Sódio - conservante - INS 250 (6%).

**DESCRIPTIVO DE EMBALAGEM**

Pacotes de polietileno azul, com peso variável, acondicionados em saco de papel kraft, com revestimento interno de polietileno, devidamente identificados e adequados à conservação do produto.

**CONDICOES DE ESTOCAGEM**

Conservar o produto em local seco e ventilado à temperatura ambiente, dentro da embalagem original.

**VALIDADE DO PRODUTO**

180 dias

**USO**


Conf.Reg.Tec.de Atrib.Adit.(I.N. n°51 de 29/12/06)

**REGISTRO MS**

Isento Registro Conf.RDC 27 de 6 Agosto 2010.

ROD RS 130, 1770 - MEDIANEIRA - ARROIO DO MEIO - 95940000  
Telefone: 51 3716-9500 - comercial@bremil.com.br

## ANEXO 15 – Ficha técnica da proteína isolada de soja



Innovation through Nature

# Nutritional Profile

## SUPRO® 596 IP

### Isolated Soy Protein

#### Typical Quantity per 100 g Product

CALORIES	From Total Fat	36 kcal
	From Saturated Fat	11 kcal
	From Unsaturated Fat	25 kcal
	From Carbohydrate	8 kcal
	From Protein	344 kcal
	<b>Total Calories<sup>1</sup></b>	388 kcal
	<b>Protein (Nx6.25)</b>	
	As-Is	86 g
	Moisture Free Basis	91 g
	Moisture	5 g
PROXIMATE	Ash	3 g
	Crude Fat (Acid Hydrolysis)	5 g
	Crude Fat (Ether Extract)	1 g
	<b>Total Fat (Triglycerides)</b>	4 g
	<b>Saturated Fat</b>	1.2 g
	Polyunsaturated Fat	2 g
	Monounsaturated Fat	0.8 g
	<b>Trans Fatty Acid</b>	Less than 0.5 g
	<b>Cholesterol</b>	0 mg
	<b>Total Carbohydrate (by difference)</b>	2 g
MINERALS	Other Carbohydrates	Not Available
	<b>Sugars</b>	Not Available
	<b>Dietary Fiber</b>	Not Available
	Soluble Fiber	Not Available
	Insoluble Fiber	Not Available
	Sugar Alcohol	Not Available
	<b>Calcium</b>	300 mg
	Chloride	Not Available
	Chromium	Not Available
	Copper	2 mg
VITAMINS	Fluoride	Not Available
	Iodine	Not Available
	<b>Iron</b>	10 mg
	Magnesium	Not Available
	Manganese	Not Available
	Molybdenum	Not Available
	Phosphorus	950 mg
	Potassium	100 mg
	Selenium	Not Available
	<b>Sodium</b>	1000 mg
	Zinc	4 mg
	Biotin	Not Available
	Choline Chloride	150 mg
	Folic Acid	200 mcg
	Niacin	2 mg
	Pantothenic Acid	0.8 mg
	Riboflavin (B <sub>2</sub> )	0.1 mg
	Thiamin (B <sub>1</sub> )	0.8 mg
	<b>Vitamin A</b>	Not Detected
	<b>Vitamin B<sub>12</sub></b>	Not Available
<b>Vitamin B<sub>6</sub></b>	Not Available	
<b>Vitamin C</b>	Less than 1 mg	
<b>Vitamin D</b>	Not Available	
<b>Vitamin E</b>	Not Available	
<b>Vitamin K</b>	Not Available	

<sup>1</sup>Calories calculated per US FDA regulation 21CFR101.9. Please consult local nutrition labeling regulations for appropriate calorie calculation.

Amino Acid Content <sup>1</sup>	Typical g AA/100g Product	Typical g AA/100g Protein	Ref. Pattern <sup>2</sup> mg/g Protein
Alanine	3.7	4.3	--
Arginine	6.5	7.6	--
Aspartic Acid	10.0	11.6	--
Cysteine	1.1	1.3	--
Glutamic Acid	17.7	20.6	--
Glycine	3.5	4.1	--
Histidine*	2.1	2.6	19
Isoleucine*	4.0	4.6	28
Leucine*	7.0	8.1	66
Lysine*	5.4	6.3	58
Methionine	1.2	1.4	--
Phenylalanine	4.5	5.2	--
Proline	4.4	5.1	--
Serine	4.5	5.2	--
Threonine*	3.3	3.8	34
Tryptophan*	1.1	1.3	11
Tyrosine	3.3	3.8	--
Valine*	4.2	4.9	35
Total Sulfur AA*	2.3	2.7	25
Total Aromatic AA*	7.8	9.0	63

\*Essential Amino Acids

<sup>1</sup>AOAC, Method 985.28, Method 994.12 and Method 988.15

<sup>2</sup>Protein Quality Evaluation, Report of Joint FAO/WHO Expert Consultation, #51 Rome, Italy, Food & Agriculture Organizations of the United Nations:1991 2-5 Yr.

This product is produced from Identity Preserved Conventional Ingredients and meets Solae's Identity Preservation Product Commitment. The basis of our commitment are a source of origin soybeans that are produced without biotechnology, with documented identity preservation at each stage of processing, independent third-party certification of conformance to defined IP procedures, and a maximum of 0.9% adventitious residual GM DNA as tested by Solae's process testing protocols.


<sup>2</sup>Calories calculated per US FDA regulation 21CFR101.9. Please consult local nutrition labeling regulations for appropriate calorie calculation.

Version: 1.0 Issue Date: 05.JULY.2010 Supersedes all previous Nutritional Profile documentation provided by Solae, LLC for this product.

Solae, LLC, North America 4300 Duncan Avenue St. Louis, MO 63110 USA Tel: 1.800.325.7108 www.solae.com	Solae Europe S.A. 2, Chemin du Pavillon CH-1218 Le Grand-Saconnex Geneva, Switzerland Tel: +41(0)22.717.64.00 www.solae.com	Solae c/o DuPont China Holding Co., Ltd. Building 11, 399 Keyuan Road, Zhangjiang Hi-Tech Park, Pudong New District Shanghai, China 201203 Tel: +86-21-3862-2323 www.solae.com	Solae do Brasil Ind. Com. Alim. Ltda Alameda Itapacuru, 506 06454-080 - Barueri - SP Brazil Tel: +55 51.3458 9000 www.solae.com
---	--	---	--

This information is based on technical data that Solae, LLC and its affiliates ("Solae") believe to be reliable, and is intended for use by persons having technical skill and at their own discretion and risk. Solae cannot and does not warrant that this information is absolutely current or accurate, although every effort is made to ensure that it is kept as current and accurate as possible. Use of Solae™ product in an application that is not intended for such product is a risk assumed by the user and because conditions of use are outside Solae's control, Solae makes no representations or warranties, express or implied, with respect to the information, or any part thereof, including any warranties of title, non-infringement of copyright or patent rights of others, merchantability, or fitness or suitability for any purpose and assumes no liability or responsibility for the accuracy, completeness, or usefulness of any information. Solae shall have no liability for the use of or results obtained from such information, whether or not based on Solae's negligence. Solae shall not be liable for (i) any damages, including claims relating to the combination of this product with any other product(s) or use of the product for a non-intended use, and (ii) special, direct, indirect or consequential damages. Solae reserves the right to make changes to this information and to this disclaimer. Solae encourages you to review this information and this disclaimer periodically for any updates or changes. Your continued access or use of this information shall be deemed your acceptance of this disclaimer and any changes and the reasonableness of these standards for notice of changes. All products denoted with ™ or ® are trademarks or registered trademarks of Solae, LLC and/or its affiliates. © 2010 Solae, LLC. All rights reserved.

## ANEXO 16 – Ficha técnica do corante carmim cochonilha

	ESPECIFICAÇÃO DO PRODUTO ACABADO PRODUCT SPECIFICATION	DATA EMISSÃO : Initial Emission Date: 29/05/07	ESPECIFICAÇÃO Nº : Specification nº: EA.7.AB.1445-008
		PÁGINA : Page : 1 of 1	DATA REVISÃO : Revision Date: 21/09/12
PRODUTO/Product: Colorfuchs Carmim 3% SAMO 20 kg / Colorfuchs Carmine 3 % SAMO 20 kg		CÓDIGO/Code: 8200141109	
ELABORADO POR / Made by: MARIA VALERIA DE SOUSA		APROVADO POR / Approved by: MARCELO AGUIAR FARIA	

**Descrição / Description:**

Produto obtido da mistura de água, umectante glicerol, corante carmim, regulador de acidez hidróxido de potássio, antiespumante dimetilsilicone, por processos tecnológicos em conformidade com os requisitos da indústria alimentícia./Product obtained from the mixture of water, humectant glycerol, colour carmine, acidity regulator potassium hydroxide, antifoaming agent dimethylsilicone, by technological processes according to the requests of the food industry.

**Atributos de Qualidade / Quality Attributes:**

Aspecto / Aspect: Líquido homogêneo. / Homogeneous liquid.

Odor / Odor: Característico. / Characteristic.

Cor / Color: Violeta escuro. / Dark violet.

Ácido Carmínico, % (FCC II) / Carminic Acid, % (FCC II)

2,8 – 3,2

pH / pH

10,5 – 13,0

Solubilidade em água, 25°C/ Water solubility, 25°C

Solúvel/ Soluble

**Características Microbiológicas / Microbiological Characteristics:**

Coliformes a 45°C, máx. (UFC/ml) / Coliforms at 45°C, max. (CFU/ml)

Salmonella sp

10

Ausência em 25ml / Absence in 25ml

**Embalagem / Package:**

Bombona plástica contendo 20kg de produto. / Plastic vessel containing 20kg of product.

**Armazenagem / Storage:**

O produto mantém suas características por 12 meses, se estocado em sua embalagem original, em local fresco e seco. / The product maintains its characteristics for 12 months, if stored in its original package, in a cool and dry place.